

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
“ FEDERICO II ”



FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE, FISICHE E NATURALI
DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA APPLICATA
XXIII CICLO

IDENTIFICAZIONE DI PROTEINE CON ATTIVITÀ DI
LEGAME AGLI mRNA DEGLI ANTIGENI MHC DI CLASSE II

Candidata

Dott.ssa Carmela Corso

Tutore

Prof. Paolo Abrescia

Co-tutore

Dott.ssa Giovanna Del Pozzo

Coordinatore

Prof. Ezio Ricca

INDICE

1	INTRODUZIONE.....	4
1.1	Il complesso Maggiore di Istocompatibilità	4
1.1.1	Organizzazione dei geni MHCII	5
1.1.2	Struttura delle molecole MHCII.....	6
1.1.3	Espressione delle molecole MHCII.....	7
1.1.4	Funzione delle molecole MHCII.....	8
1.1.5	Regolazione trascrizionale dei geni MHCII.....	9
1.1.6	CIITA, il trans attivatore dei geni MHC di classe II	10
1.1.7	Espressione delle molecole MHCII nei tumori	12
1.2	Regolazione post-trascrizionale degli mRNA	14
1.2.1	<i>Turnover</i> degli mRNA e controllo traduzionale	14
1.2.2	Regolazione coordinata e dinamica degli mRNA: il modello dell'operone a RNA.....	18
1.3	Regolazione post-trascrizionale dei geni MHCII	21
1.4	Obiettivo della tesi	23
2	MATERIALI E METODI	24
2.1	Reagenti e colture cellulari	24
2.2	Preparazione degli estratti cellulari.....	24
2.3	Purificazione di EBP1.....	25
2.4	Saggio colorimetrico per la determinazione della concentrazione proteica totale	26
2.5	Elettroforesi e <i>immunoblotting</i>	27
2.6	Cromatografia di affinità e a scambio anionico.....	29
2.7	Analisi NanoESI-MS/MS.....	31
2.8	Reazione a catena della polimerasi (PCR)	31
2.9	Purificazione dei prodotti di PCR	32
2.10	Trascrizione <i>in vitro</i> delle sonde a RNA.....	33
2.11	Saggio di legame all'RNA (REMSA).....	34

2.12	Saggio di legame all'RNA (<i>Northwestern Blot</i>).....	36
2.13	Analisi al citofluorimetro	37
2.14	Transfezione e silenziamento genico	37
2.15	Estrazione dell'RNA totale	39
2.16	Preparazione del cDNA e analisi per <i>Real time</i> PCR quantitativa	40
2.17	Saggi di stabilità mediante l'uso dell'Actinomicina D	42
3	RISULTATI	44
3.1	Identificazione di proteine con attività di legame agli mRNA codificanti gli antigeni MHC di classe II	44
3.1.1	Saggi di attività di legame delle sonde marcate di RNA 3-DRA, 3-DQA1 e 3-DRB1 con estratti citoplasmatici.....	45
3.1.2	Purificazione e identificazione delle proteine.....	49
3.1.3	Analisi del complesso di legame	54
3.2	Modulazione dell'espressione dei messaggeri MHCII in seguito al silenziamento degli mRNA codificanti le proteine EBP1 e NF90	56
3.2.1	Analisi della riduzione di EBP1 e NF90 per <i>Western blot</i> e citofluorimetria.....	56
3.2.2	Effetto della riduzione di EBP1 e NF90 sugli mRNA MHCII.....	59
3.2.3	Effetto della riduzione di EBP1 e NF90 sulla stabilità degli mRNA MHCII.....	61
3.3	Analisi della coregolazione degli mRNA per HLA-DRA e HLA-DRB1	63
3.3.1	Transfezione dei cDNA di HLA-DRA e HLA-DRB1	64
3.3.2	Silenziamento degli mRNA HLA-DRA e HLA-DRB1	66
4	DISCUSSIONE.....	68
5	BIBLIOGRAFIA	76
6	RINGRAZIAMENTI	82

1 INTRODUZIONE

1.1 Il complesso Maggiore di Istocompatibilità

Il complesso Maggiore d'Istocompatibilità o anche *Major Histocompatibility Complex* (MHC) raggruppa un insieme di geni polimorfici coinvolti nel controllo della risposta immune. Il *locus* MHC umano, definito complesso HLA da *Human Leucocyte Antigen*, è localizzato sul braccio corto del cromosoma 6 e occupa un esteso segmento genomico della lunghezza di circa 3500 Kb. Il complesso MHC comprende i geni di classe I e di classe II, codificanti rispettivamente per gli antigeni di classe I e II, i geni per il complemento e anche geni codificanti per proteine da shock termico e per citochine (TNF, LT)(Figura 1).

I prodotti genici tipici del complesso MHC, gli antigeni MHC, sono stati inizialmente identificati per il ruolo da essi svolto nello stimolare risposte cellulari T che causavano il rigetto di tessuti trapiantati. Solo in seguito si è potuto verificare l'esistenza delle due principali classi, responsabili di situazioni fisiologiche e talvolta patologiche nettamente differenti nell'ambito dell'organismo. Infatti mentre i prodotti dei geni MHCI sono antigeni direttamente implicati nel fenomeno del rigetto, quelli che derivano dai geni MHCII sono attivi nei fenomeni di cooperazione cellulare che si verificano nell'ambito della risposta immunitaria. Gli antigeni MHC di classe I sono espressi dalla maggioranza dei tipi cellulari in condizioni fisiologiche e sono implicati nella presentazione di peptidi antigenici endogeni, derivati cioè da proteine di origine virale o tumorale, originatesi nel reticolo endoplasmatico. Gli antigeni di classe II hanno un'espressione tessuto-specifica, sono presenti principalmente sulla superficie di cellule specializzate del sistema immune definite *Antigen Presenting cells* (APC), quali linfociti B, cellule

dendridiche e macrofagi e sono implicate nella presentazione di peptidi antigenici esogeni, derivati cioè da proteine di origine extracellulare, da prodotti di necrosi in seguito a lisi cellulare, o generatesi dai meccanismi di endocitosi di microrganismi da parte delle APC.

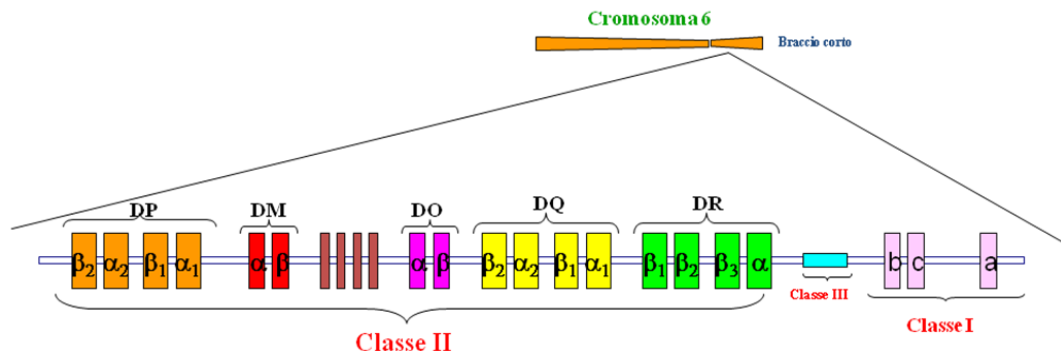


Figura 1. Rappresentazione schematica delle molecole MHC

1.1.1 Organizzazione dei geni MHCII

Nell'uomo lo studio della regione MHC di classe II ha permesso di identificare tre loci HLA-DP, HLA-DR e HLA-DQ, all'interno dei quali possono esistere due o tre geni funzionali per la catena β , e solitamente un gene funzionale per la catena α . L'uso di più di un gene funzionale per la catena β permette ad alcuni prodotti dei geni di classe II di essere espressi in più di due forme alleliche in una singola cellula. Di solito un individuo può esprimere da 10 a 20 differenti prodotti di geni di classe II per ogni cellula. All'interno della regione di classe II sono compresi inoltre anche altri geni, denominati HLA-DMA e HLA-DMB, che codificano per una molecola eterodimerica di tipo classe II, in grado di favorire il legame del peptide alle molecole polimorfiche di classe II (Figura 1).

In tutti i geni MHC umani lo schema generale di organizzazione è molto simile: il primo esone codifica per la sequenza *leader*, che indirizza la proteina

nascente verso il reticolo endoplasmatico mentre gli altri quattro esoni codificano per ognuna delle regioni extracellulari, $\alpha 1$ e $\alpha 2$ oppure $\beta 1$ e $\beta 2$, per la regione transmembrana e intracitoplasmatica e infine un esone per la 3'UTR.

1.1.2 Struttura delle molecole MHCII

Le molecole MHC di classe II sono glicoproteine transmembrana espresse sulla superficie di cellule specializzate del sistema immunitario. Esse si presentano sotto forma di eterodimeri, costituiti da una catena alfa di 32-34 kDa e da una catena beta di 29-32 kDa (codificate da geni separati A e B), tenute insieme da interazioni estremamente forti di tipo non covalente. Generalmente in queste molecole si distinguono un dominio che lega il peptide, un dominio transmembrana e un dominio intracitoplasmatico. Le porzioni extracellulari delle catene α e β sono divise in due segmenti indicati rispettivamente come $\alpha 1$ e $\alpha 2$ o $\beta 1$ e $\beta 2$; la regione che lega il peptide è quella che si forma dall'interazione tra $\alpha 1$ e $\beta 1$ che si ripiegano a formare una sorta di tasca. Le estremità carbossi-terminali sono costituite da un segmento di amminoacidi idrofobici che attraversano la membrana. Entrambe le catene terminano con una sequenza di residui amminoacidici basici a cui segue una coda idrofila intracitoplasmatica [1, 2].

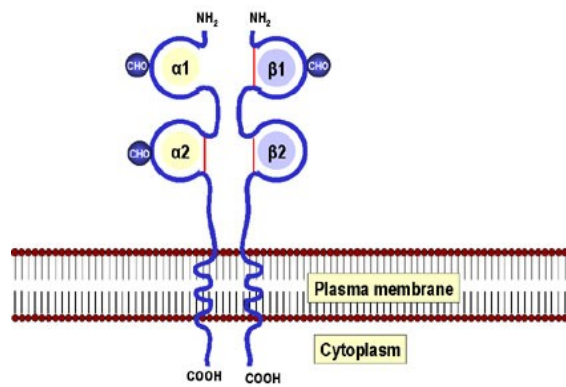


Figura 2. Rappresentazione schematica della molecola MHCII

1.1.3 Espressione delle molecole MHCII

A causa dell'importanza del ruolo delle molecole MHCII, il sistema immunitario ha sviluppato meccanismi molecolari che controllano la loro espressione secondo uno schema molto rigoroso. Esistono generalmente due tipi di espressione delle molecole MHCII: costitutiva e inducibile. L'espressione costitutiva è principalmente riservata alle cellule epiteliali timiche (TEC) e a cellule specializzate nella cattura e presentazione dell'antigene, le APC (cellule B, macrofagi e cellule dendritiche), come precedentemente accennato. Tutti gli altri tipi cellulari normalmente non esprimono le molecole MHC di classe II, anche se l'espressione può essere indotta in cosiddette "APC non professionali", (come, fibroblasti, cellule endoteliali, cellule T e alcune cellule tumorali) da una varietà di stimoli, tra cui l'IFN- γ (prodotto durante le infezioni), le infiammazioni o i traumi [3]. Il livello di espressione delle molecole MHCII varia anche in funzione allo stadio di sviluppo della cellula APC. Infatti le cellule B reprimono la trascrizione dei geni MHCII quando si differenziano in plasmacellule e allo stesso modo, le cellule dendritiche, silenziano i geni MHCII, quando sono sottoposte a maturazione. Difetti

nella funzione o nell'espressione delle molecole MHCII possono avere gravi conseguenze. La mancata espressione delle molecole MHCII genera una immunodeficienza indicata come BLS, da "Bare Lymphocyte Syndrome" (sindrome da linfocita nudo), in cui è gravemente compromesso il sistema immunitario [4].

1.1.4 Funzione delle molecole MHCII

Le molecole MHC di classe II rivestono un ruolo centrale nell'induzione e nella regolazione della risposta immune adattativa al patogeno e nel mantenimento della tolleranza al self. Esse hanno il compito di presentare frammenti peptidici derivanti da antigeni proteici e di esporli sulla superficie delle cellule perché avvenga il riconoscimento da parte dei linfociti T. Questo è un processo che comunemente viene definito: processazione e presentazione dell'antigene. Più precisamente, le proteine extracellulari vengono internalizzate dalle APC in compartimenti endosomiali/lisosomiali e degradate in peptidi, mediante l'azione di enzimi proteolitici. Le molecole MHCII neosintetizzate si associano ad una proteina accessoria, la catena invariante (Li) e vengono trasportate dal reticolo endoplasmatico alle vescicole endosomiali. Qui la catena invariante viene tagliata enzimaticamente, ed il piccolo peptide che rimane legato alla tasca della molecola MHC, chiamato CLIP, vien rimosso dall'intervento della molecola HLA-DM, che lo assume nella propria tasca di legame. I peptidi, generati dalla proteolisi delle proteine extracellulari, possono quindi legarsi alla tasca delle molecole di classe II, ora libera, ed i complessi trimerici (catena α , catena β e peptide) possono quindi essere veicolati alla superficie delle APC dove sono presentati ai linfociti CD4⁺. Il complesso viene riconosciuto dal recettore TCR

presente sulla superficie dei linfociti T CD4⁺ e attiva varie risposte funzionali, quali proliferazione e differenziamento in cellule effettrici [1].

1.1.5 Regolazione trascrizionale dei geni MHCII

Una caratteristica rilevante dei geni MHCII è che essi sono regolati in maniera altamente coordinata. In generale essi sono tutti attivi o tutti silenti. Anche i geni MHCII “non classici”, come HLA-DM, HLA-DO, o quello codificante per la catena invariante (Ii), sono coregolati insieme ai geni MHCII classici (HLA-DR, DQ e DP). Questo tipo di regolazione vale sia per le APC che per le cellule stimulate con INF γ . La spiegazione è dovuta al fatto che tutti i geni MHCII (quelli classici e non) condividono la stessa struttura del promotore e lo stesso apparato trascrizionale.

L'elemento regolatore più importante, altamente conservato, è il modulo S-Y, costituito dalle sottoregioni: S, X, ed Y, mostrati in Figura 3. La box S è lunga 7 nucleotidi. La box X è distinta in due elementi, X e X2, parzialmente sovrapposti e lunghi rispettivamente 15 e 8 nucleotidi. Infine, la box Y, localizzata a valle della X, è composta da 10 nucleotidi ed è situata approssimativamente a 40-90 basi dal sito di inizio della trascrizione [5]. Tali regioni regolatrici rappresentano dei siti di legame di più di venti fattori proteici nucleari che formano un complesso multiproteico chiamato “enhanceosoma” dell'MHCII [6]. All'interno di esso, il motivo X è riconosciuto dal fattore RFX, una proteina trimerica composta da RFX5, RFXANK e RFXAP, la box X2 è occupata dal fattore CREB [7], e il motivo Y è legato da un fattore di trascrizione trimerico chiamato fattore nucleare Y (NF-Y). La box S non è stata estensivamente studiata. L'assemblaggio dell'enhanceosoma sul modulo S-Y richiede interazioni cooperative tra tutti i suoi componenti.

L'occupazione delle sequenze S-Y da parte dell'*enhanceosoma* è il prerequisito per l'attivazione dell'espressione dei geni MHCII; l'importanza di tutti i fattori dell'*enhanceosoma* è tale da provocare, nel caso di una mutazione anche in uno solo di essi, la mancata espressione delle molecole MHC di classe II e la conseguente immunodeficienza BLS [4].

1.1.6 CIITA, il trans attivatore dei geni MHC di classe II

L'*enhanceosoma*, tuttavia, non può attivare la trascrizione in assenza del trans-attivatore di classe II (CIITA). CIITA è una proteina che non lega direttamente il DNA ma stabilisce interazioni proteina-proteina, a livello della regione promotrice prossimale S-X-X2-Y. E' espressa costitutivamente nelle APC professionali e inducibile in quelle non professionali. L'espressione del gene che codifica CIITA, MHC2TA, è guidata da tre differenti promotori cellula-specifici e inducibili, pI, pIII e pIV [8].

Il pattern d'espressione dei geni di classe II è strettamente legato all'attivazione di CIITA [9] ma il modo in cui esso funzioni da promotore trascrizionale è ancora una questione aperta. Lavori in letteratura indicano che CIITA viene reclutato dai geni bersaglio tramite interazioni proteina-proteina con diversi componenti dell'*enancheosoma* [10, 11], promuove il rimodellamento della regione promotrice reclutando la proteina CBP, la quale lega l'enzima CREB che ha un'attività acetiltrasferasica sulle proteine istoniche [12]. Inoltre interagisce con diversi fattori dell'apparato trascrizionale basale quali TBP, TAF_{II}32, TAF_{II}70, TFIID and P-TEFb [13] e pertanto potrebbe influenzare l'assemblaggio e il funzionamento del complesso di pre-inizio (Figura 3). Il trans-attivatore di classe

II, dunque, CIITA media tutti gli eventi molecolari richiesti per l'attivazione della trascrizione di questi geni e pertanto è stato definito “master controller” dell'espressione dei geni MHCII.

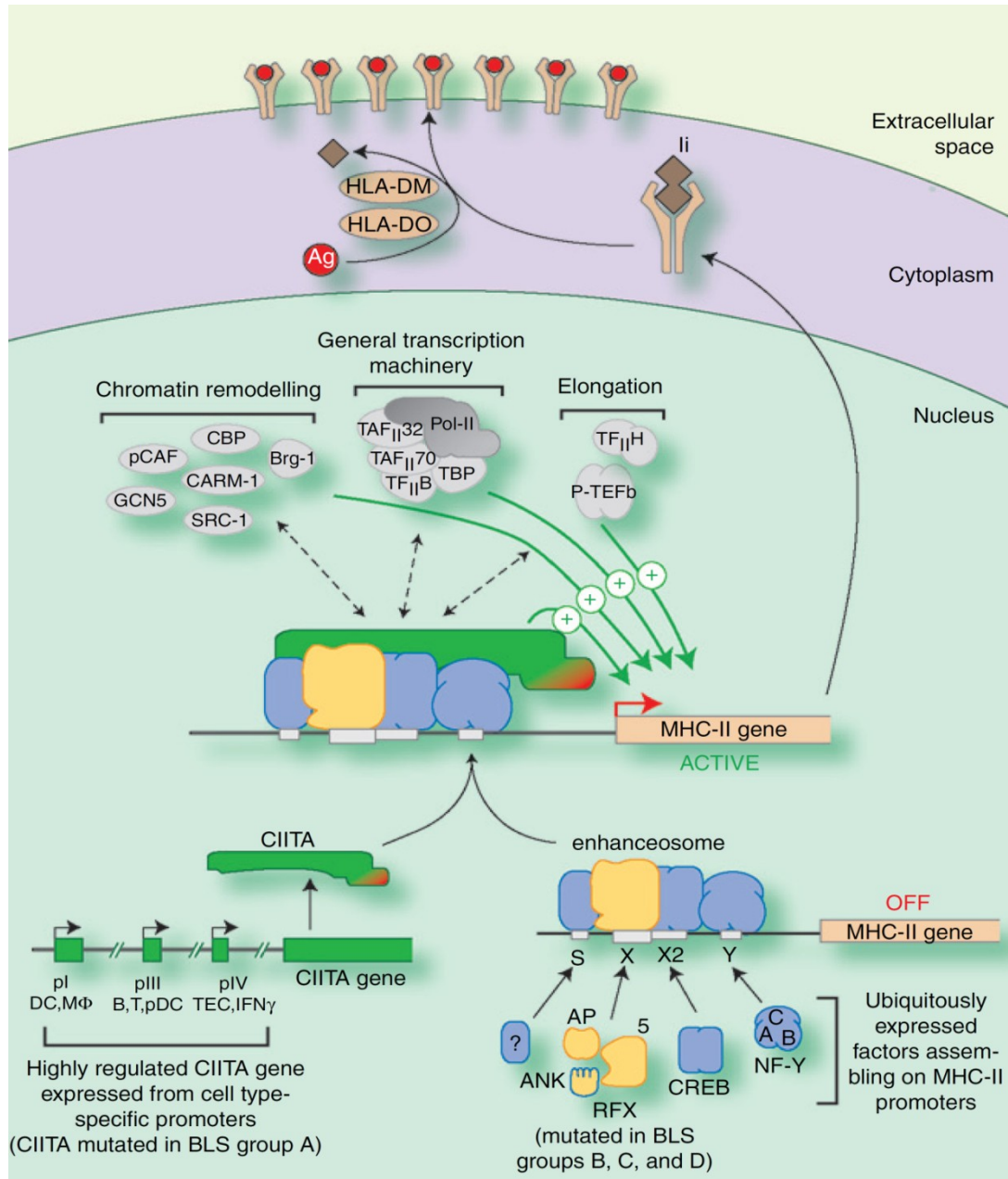


Figura 3. Una visione generale della regolazione dell'espressione dei geni MHCII.

1.1.7 Espressione delle molecole MHCII nei tumori

Come già accennato precedentemente l'espressione costitutiva o inducibile degli antigeni di classe II è principalmente associata alle cellule presentanti l'antigene (APC). Tuttavia un'espressione spuria di tali molecole è stata descritta in diversi tessuti neoplastici e in linee cellulari da questi derivate, che talvolta possono trascrivere i geni MHCII in maniera costitutiva o inducibile da citochine e diventare cellule "non professionali" presentanti l'antigene [14]. La risposta immunitaria al cancro è dipendente principalmente dai linfociti T CD8 citotossici (CTL), che sono attivati da APC presentanti antigeni endogeni, e quindi anche antigeni tumorali, in associazione principalmente alle molecole MHC di classe I. Di conseguenza anche l'immunoterapia del cancro si è concentrata sull'identificazione degli epitopi tumorali e sulla risposta CTL antigene-specifica. Recentemente, però sempre maggiore importanza è stata data al ruolo delle cellule CD4 nell'immunoterapia del cancro. Questi linfociti T helper (Th), una volta attivati in maniera antigene specifica, possono favorire l'immunità anti-tumorale stimolando i linfociti CTL che hanno il precipuo compito di distruggere le cellule tumorali. A sua volta il linfocita CD4 può essere attivato da APC presentanti antigeni tumorali MHCII ristretti o direttamente dalle cellule tumorali esprimenti gli antigeni in associazione alle molecole MHC di classe II [15]. Tali cellule tumorali che quindi possono essere definite cellule non professionali presentanti l'antigene, generalmente non esprimono le molecole co-stimolatorie, tipiche delle APC e quindi la loro efficacia nell'attivare le T helper è minore.

Generalmente le cellule tumorali possono esprimere o meno le molecole MHCII. Le cellule tumorali di origine ematopoietica possono mostrare una diminuzione dell'espressione di queste molecole rispetto allo stesso tipo cellulare

non tumorale e ciò è correlato ad un alto potenziale metastatico, ad una prognosi negativa e anche ad una perdita di immunosorveglianza [16, 17]. Invece per i tumori di origine non ematopoietica non c'è una chiara relazione tra espressione e prognosi, in particolare per quanto riguarda il carcinoma gastrico, coloretale, mammario e il melanoma [18].

In alcuni casi, un'elevata espressione della molecola HLA-DR è stata riscontrata nel carcinoma della cervice uterina, della mammella, del colon-retto e della laringe ed appare principalmente indotta da IFN- γ prodotto dai linfociti infiltranti [19, 20].

La capacità di esprimere MHCII dei melanomi, mielomi e gliomi spesso è dovuta all'attivazione del transattivatore di classe II CIITA sotto il controllo dei promotori PIII e PIV [9]; ciò conferisce a questi tessuti il ruolo di APC non professionali. Al contrario, la causa principale della perdita dell'espressione costitutiva o inducibile delle molecole MHC di classe II, in cellule tumorali di origine emopoietiche o non emopoietiche, è il silenziamento epigenetico del gene che codifica CIITA [21].

In conclusione, se l'aumento o la diminuzione dell'espressione delle molecole MHC di classe II in cellule cancerose è spesso una conseguenza di una alterazione genetica (mutazioni puntiformi, delezioni, inserzioni), ampiamente descritte in letteratura, altrove, la modulazione dell'espressione delle molecole MHCII potrebbe essere una conseguenza dei meccanismi di regolazione che si verificano a livello trascrizionale, post-trascrizionale ed epigenetico. Per esempio, dati recenti indicano che in cellule di melanoma oculare la perdita dell'espressione inducibile da INF- γ è dovuta ad una regolazione post-trascrizionale ed epigenetica [22, 23]. Quindi gli eventi che consentendo alle cellule tumorali di diventare cellule

presentanti APC non professionali potrebbero avvenire a livello post-trascrizionale e influenzare la densità superficiale delle molecole MHCII e l'immunogenicità cellulare.

1.2 Regolazione post-trascrizionale degli mRNA

Al primo livello di regolazione genica che è quello trascrizionale, storicamente più studiato e che si verifica nel nucleo, segue un secondo livello di regolazione genica che è quello post-trascrizionale, che avviene generalmente nel citoplasma. Le regioni presenti alle estremità 5' e 3' UTR degli mRNA rappresentano importanti elementi di regolazione, in particolare si attribuisce all'estremità 3' un più ampio ruolo regolativo sulle molecole di messaggero, come, ad esempio, il trasporto, la localizzazione, la stabilità e la traduzione [24]. Essenziali in questi ed in altri processi cellulari sono le proteine che legano l'RNA, definite appunto *RNA binding proteins* (RBP) e la conseguente formazione di complessi ribonucleoproteici (RNP) di regolazione.

1.2.1 *Turnover* degli mRNA e controllo traduzionale

Gli RNA eucariotici sono caratterizzati dall'avere una considerevole variabilità per quanto concerne la loro vita media, che può andare da pochi min a molti giorni. Agendo sulla stabilità di una molecola di mRNA, una cellula, può rispondere rapidamente ad uno stimolo esterno e bloccare l'espressione di un particolare prodotto proteico. La degradazione delle molecole di mRNA è un processo altamente regolato in quanto riveste un ruolo critico nella regolazione dell'espressione genica. E' noto che la sensibilità alla degradazione dipende da

sequenze che costituiscono il bersaglio dell'attacco endonucleolitico, mentre la resistenza è conferita da regioni che impediscono l'avanzamento delle esonucleasi lungo la molecola. Una serie di evidenze suggeriscono che un fattore sicuramente implicato è rappresentato da un elemento presente al 3', non codificato dal DNA, ma aggiunto all'interno del nucleo: una coda di residui di acido adenilico detta anche poly (A). Questo elemento conferisce stabilità alle molecole di messaggero e la sua rimozione precede a volte la degradazione di alcuni messaggeri [25]. La protezione del messaggero dalla degradazione sembra dipendere dal suo legame con una proteina chiamata PAPB (da *PolyA- Binding Protein*) [26]. Inoltre è stato osservato che la poliadenilazione avrebbe importanti effetti sul trasporto, e che la PAPB sarebbe in grado di modulare l'efficienza traduzionale delle molecole di messaggero [27]. Esistono, però, messaggeri privi della coda poly (A): è il caso degli mRNA codificanti per le proteine istoniche. Questi messaggeri vengono intensamente trascritti durante la duplicazione del DNA, e la loro quantità può aumentare fino a 50 volte; nel momento in cui questa fase termina, le molecole di mRNA vengono velocemente degradate attraverso una modulazione della stabilità. In questa rapida degradazione è implicata una struttura secondaria, uno "stem-loop", altamente conservata durante l'evoluzione, presente nella regione al 3' di questi messaggeri a cui si legherebbe un fattore proteico [28].

L'emivita dei trascritti è determinata anche da elementi di controllo localizzati di solito nelle 3'UTR degli mRNA, riconosciuti da varie RBP. Le sequenze ARE "*AU Rich element*" sono gli elementi di controllo della stabilità meglio caratterizzati [29]. Una sequenza ARE è caratterizzata dalla ripetizione, spesso sovrapposta, del pentamero AUUUA all'interno di regioni ricche in uridine nella 3'UTR. Questa sequenza è stata ritrovata in tutti quei geni che devono rispondere

velocemente ad uno stimolo esterno, come un ormone o un fattore di crescita, oppure in geni coinvolti nell'infiammazione cronica o nel cancro [30]. In particolare la ritroviamo nella sequenza 3'UTR di messaggeri codificanti per fattori di crescita come *GM-CSF*, *EGF-receptor* [31], per citochine come IL-2 e il $\text{TNF}\alpha$ [32], e per i protooncogeni *c-fos* e *c-myc*. La funzione destabilizzante delle ARE è determinata dall'interazione di fattori specifici che legano questi elementi e ne inducono prima la deadenilazione e poi la degradazione.

Sono state identificate numerose proteine *ARE-binding*, il cui ruolo nella regolazione della stabilità dei trascritti è supportata da osservazioni sperimentali [33, 34]. Queste proteine possono promuovere non solo la degradazione dell'RNA come dimostrato per TTP, AUF e BRF1 [35, 36], ma anche aumentarne la stabilità, come nel caso di HuR [37].

Un altro importante momento di controllo post-trascrizionale è rappresentato dalla traduzione. La traduzione degli RNA messaggeri rappresenta lo stadio finale della conversione dell'informazione genomica nella sequenza amminoacidica di un polipeptide. I meccanismi di controllo della sintesi proteica sono usati per modulare finemente e in maniera spazio-temporale l'espressione genica in un ampio *range* di situazioni biologiche. Esistono diversi elementi strutturali all'interno di un mRNA che sono in grado di influenzare la traduzione: la struttura del CAP all'estremità 5' e la coda di poly (A) all'estremità 3', sono ad esempio motivi che promuovono fortemente la traduzione; le sequenze IRES (*Internal Ribosome Entry Sequence*), invece mediano un inizio di traduzione cap-indipendente; le uORF (*Upstream Open Reading Frames*) normalmente funzionano come regolatori negativi riducendo la traduzione dell'ORF principale; e infine

esistono strutture secondarie o terziarie come le *hairpins* che normalmente bloccano la traduzione [38].

La decisione di tradurre, reprimere temporaneamente o inviare a degradazione un messaggero è determinata anche da microRNA (miRNA) che generano un silenziamento genico (*miRNA-mediated mRNA silencing*) e da un meccanismo che prende il nome di NMD (da *Nonsense mediated mRNA decay*) [39]. Il primo è un meccanismo che assicura che una certa proteina è espressa ad un livello adeguato tale da consentire la normale funzione cellulare, invece, l'NMD è un meccanismo di sorveglianza che rivela ed elimina mRNA aberranti la cui espressione si tradurrebbe in proteine tronche deleterie per l'organismo. Ovviamente entrambi i processi sono fortemente influenzati dalla formazione di complessi dinamici ribonucleoproteici e anche il legame di fattori proteici alla regione 3'UTR gioca un ruolo chiave.

Il meccanismo di silenziamento operato dai miRNA prevede un appaiamento delle basi dei miRNA con la regione 3'UTR del loro mRNA bersaglio. Ciò può promuovere l'inibizione diretta dell'inizio della traduzione o in alternativa, può accelerare la deacetilazione dell'mRNA bersaglio con la conseguente repressione della traduzione o degradazione dell'mRNA [40, 41]. Un esempio di regolazione traduzionale effettuata dai miRNA è dato proprio dai primi microRNA identificati, *lin-4* and *let-7*, i quali agiscono reprimendo la traduzione degli mRNA bersaglio *lin-14*, *lin-28*, and *lin-41* [42, 43]. Più recentemente, è stato dimostrato che *miR-17* and *miR-20* insieme reprimono la traduzione di *E2F1* nelle cellule Hela.

Il meccanismo di sorveglianza NMD è in grado di riconoscere su un mRNA un codone di stop anticipato [44]. Normalmente nei trascritti eucariotici il codone di stop è localizzato sull'ultimo esone. La presenza di un codone di stop, a valle

dell'inizio, in un esone diverso dall'ultimo, configura uno stop prematuro che etichetta l'mRNA per l'immediata degradazione. Viene così innescato l'NMD. Vengono reclutate proteine specifiche che rimuovono dapprima il cap al 5' e l'mRNA, privo del cap, viene rapidamente degradato da una esonucleasi 5'-3'. Spesso il meccanismo dell'NMD avviene in concomitanza di eventi di *splicing* e in mRNA poliadenilati, come nel caso dei messaggeri della beta globina [45].

1.2.2 Regolazione coordinata e dinamica degli mRNA: il modello dell'operone a RNA

I processi post-trascrizionali ricoprono un ruolo centrale nella regolazione dell'espressione genica eucariotica. Anche se è noto che questi processi sono funzionalmente collegati, spesso da fattori proteici comuni, solo recentemente è divenuto evidente che molti di questi processi sono anche fisicamente connessi.

È il caso delle proteine che sono coinvolte nella degradazione degli mRNA, nella repressione traduzionale, nella sorveglianza e nel silenziamento genico mediato da miRNA, che insieme con i loro "mRNA bersaglio" colocalizzano entro distinti domini citoplasmatici, detti granuli citoplasmatici mRNP. Ne esistono di due tipi: gli "stress granuli" e i "P bodies". I primi, che contengono mRNA non tradotti, componenti dell'apparato di inizio della traduzione e proteine accessorie [46], sono complessi che modulano la traduzione e la stabilità dei messaggeri, si formano in risposta allo stress e sono collegati ai processi di apoptosi. I "P bodies", contengono oltre che messaggeri non tradotti e repressori della traduzione anche componenti di degradazione degli mRNA, e sono siti in cui è deciso, tra arresto della traduzione o degradazione, il destino degli mRNA accumulati [47]. Gli *stress-*

granuli e dei *P bodies* possono interagire fra di loro [48], e insieme rivelano un'organizzazione dinamica degli mRNP, in distinti compartimenti nel citosol, con funzione di controllo dell'espressione genica e modulazione degli mRNA citoplasmatici.

Dati recenti hanno dimostrato che multipli RNA sono regolati, per mezzo di interazione sequenza-specifiche, da una o più RNA *binding proteins*, le quali ne orchestrano lo *splicing*, l'esporto nucleo-citoplasma, la stabilità, la localizzazione e la traduzione. Queste osservazioni hanno dato origine ad un modello di regolazione dell'espressione genica, chiamato "Operone a RNA". Esso è fondato, in analogia agli mRNA policistronici (cioè che portano l'informazione insieme per più geni) generati da operoni batterici, sulla regolazione coordinata da parte di RBP, di multipli mRNA monocistronici (ovvero quei messaggeri che portano l'informazione per un solo gene) che codificano per proteine funzionalmente correlate. L'operone a RNA prevede che messaggeri funzionalmente correlati sono tenuti insieme nel tempo e nello spazio di modo che le proteine codificate da questi ultimi possono essere prodotte in concerto in modo coordinato. Mentre sono ancora in fase di trascrizione, gli mRNA sono legati da RBP assemblati ed esportati nel citoplasma come è mostrato in Figura 4, pannello A. L'Operone a RNA regola la stabilità e la traducibilità degli mRNA, garantendo l'espressione coregolata di un insieme di proteine che intervengono nella stessa via metabolica o che formano un complesso macromolecolare. RBP e miRNA possono influenzare la stabilità dei trascritti, attivare o reprimere la loro traduzione indirizzando i messaggeri ai ribosomi o ai *P-bodies*. Questi fattori agiscono *in trans* interagendo con uno o più elementi definiti "users", ovvero sequenze consenso o strutture secondarie *stem loop* [49]. Sono proprio le combinazioni dei miRNA e delle RBP con i diversi *users* a

determinare quali saranno gli effetti della regolazione coordinata dei trascritti. La costruzione di ogni operone è determinata dal legame delle RBP e dagli *users* (Figura 4, pannello B) e ogni mRNA, se contiene più *users* può essere raggruppato in diverse combinazioni.

L'esistenza, quindi di una regolazione coordinata e dinamica degli mRNA dimostra che i trascritti sono membri di una infrastruttura altamente organizzata che funziona a partire dalla trascrizione degli mRNA fino alla sintesi delle proteine.

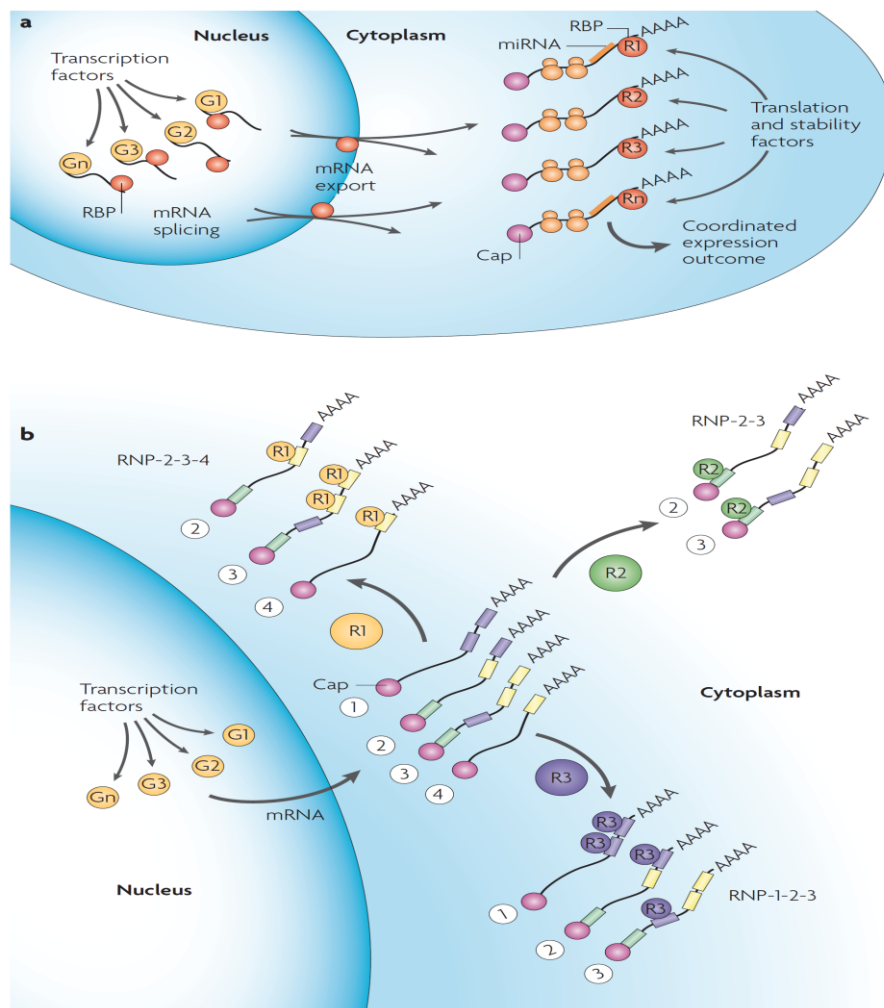


Figura 4. Regolazione coordinata di un gruppo di mRNA dalla trascrizione alla traduzione. Il modello dell'operone a RNA.

1.3 Regolazione post-trascrizionale dei geni MHCII

Molti studi sono stati effettuati sulla trascrizione dei geni MHC di classe II, ma si conosce poco sui meccanismi di regolazione post-trascrizionali. Negli ultimi anni, tuttavia, si sono accumulate alcune osservazioni sperimentali dell'esistenza di meccanismi attivi a livello della stabilità e della traduzione dei trascritti, sia in topo che nell'uomo. Un primo studio effettuato sulla stabilità dei messaggeri di classe II [50], aveva dimostrato che la vita media di questi mRNA, misurati in cellule della linea B linfoblastoide, Raji, in seguito al blocco della trascrizione con ActinomicinaD è di circa 8-10 ore. Tuttavia se si utilizzava un inibitore della sintesi proteica, quale la cicloesimmide, la vita media di questi mRNA risultava essere drasticamente diminuita a circa un'ora. Questi dati indicavano l'esistenza di un fattore proteico che determinava una stabilizzazione del messaggero e la cui mancanza ne accelerava la degradazione. Tale tipo di modulazione risultava quindi essere un po' diversa da quella generalmente studiata per alcuni messaggeri instabili, quali quelli caratterizzati dalla presenza nel loro 3'UTR di sequenze ARE, per i quali il blocco della sintesi proteica determina un aumento della stabilità. Il fatto che la sintesi proteica fosse necessaria per la stabilizzazione dei trascritti ha permesso di ipotizzare l'esistenza di un meccanismo di controllo della stabilità associata alla traduzione.

Per studiare ulteriormente la relazione tra controllo della stabilità e traduzione dei messaggeri di classe II sono stati fatti degli esperimenti in vitro di misurazione della degradazione dell'mRNA associato ai polisomi, derivati da cellule B trattate con inibitori della sintesi proteica. In particolare si è visto che l'mRNA del gene HLA-DRA associato ai polisomi è degradato a causa dell'azione di RNasi associate ai ribosomi [51]. Un approccio diverso era stato quello di verificare

l'esistenza di una proteina o di un complesso che legasse le molecole di mRNA del gene HLA-DRA a livello delle sue regioni UTR. Infatti è stata dimostrata l'esistenza di una sequenza di circa 100 nucleotidi nella 3' UTR, che lega una proteina e/o un complesso sia a localizzazione nucleare che citoplasmatica e che protegge l'mRNA dalla digestione con RNasi. Si tratta quindi di complessi che migrano con velocità diverse su un gel non denaturante e che sono probabilmente differenti in una o più costituenti. Questa interazione mRNA-proteine è stata associata al trasporto nucleo-citoplasma dei messaggeri [52].

1.4 Obiettivo della tesi

Studi preliminari sull'interazione di estratti proteici con le regioni 3' UTR dei messaggeri MHC di classe II hanno fornito una dimostrazione diretta del legame tra proteine citoplasmatiche e gli mRNA degli antigeni MHCII.

Lo scopo di questo progetto è stato quello di identificare e caratterizzare le proteine coinvolte nel complesso di legame con i trascritti MHCII. Due proteine, Ebp1 e DRBP76/NF90, sono state individuate come componenti di questo complesso proteico. Al fine di definire il loro ruolo funzionale è stata valutata la modulazione e la stabilità dei messaggeri MHCII, in seguito ad esperimenti di silenziamento utilizzando "*small interfering RNA*" specifici per gli mRNA delle proteine individuate.

Inoltre abbiamo investigato su una possibile co-regolazione dei messaggeri MHCII. L'ipotesi avanzata è quella secondo cui il *processing* degli mRNA degli antigeni MHCII, codificanti molecole diverse ma con la stessa funzione di presentazione dell'antigene, avverrebbe in modo coordinato all'interno di una struttura ribonucleoproteica, ovvero l' "operone a RNA" [49], tale da garantire un equilibrio delle catene polipeptidiche alfa e beta costituenti gli eterodimeri MHCII.

Lo studio dell'interazioni delle proteine identificate ai geni MHCII, potrebbe accrescere le nostre conoscenze sui meccanismi che sono alla base della presentazione dell'antigene nelle cellule tumorali.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Reagenti e colture cellulari

Sono state utilizzate linee cellulari da melanoma e linfoma. La linea cellulare M14 è derivata da tumori primari di pazienti affetti da melanoma [53] mentre la linea cellulare Raji da una linfoma B [54]. Entrambe le linee cellulari sono state cresciute in terreno RPMI 1640 (Lonza), supplementato al 10% con siero fetale bovino (Gibco) in presenza di 100 µg/ml di antibiotici streptomicina e penicillina (Sigma). Tutte le cellule in coltura sono state incubate a 37°C, in incubatori umidificati con un'atmosfera al 10% di CO₂.

2.2 Preparazione degli estratti cellulari

Per la preparazione degli estratti citoplasmatici, designati comunemente S100, 200x10⁶ cellule sono state prima allontanate dal mezzo di coltura, mediante centrifugazione a 500 *g* per 10 min a temperatura ambiente (TA), e poi lavate 2 volte con DPBS freddo (0.0095 M PO₄) (Lonza), nelle stesse condizioni di centrifugazione riportate sopra. I successivi passaggi sono stati condotti a 4°C. Dopo i lavaggi, il *pellet* cellulare è stato risospeso in 5 volumi di tampone A (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 1X miscela di inibitori di proteasi, Roche) ed è stato nuovamente centrifugato per 5 min a 500 *g*. Una volta allontanato il supernatante, le cellule sono state risospese in 3 volumi di tampone A e incubate in ghiaccio per 10 min. A questo punto, le cellule sono state lisate con l'aiuto di un pestello in un omogeneizzatore di vetro, e l'omogenato è stato osservato, dapprima, al microscopio per verificare l'avvenuta

lisi cellulare, e successivamente centrifugato per 15 min sempre a basse gravità. Il supernatante è stato trattato con 0,11 volumi di tampone B (0.3 M HEPES pH 7.9, 30 mM MgCl₂, 1.4 M KCl, inibitori di proteasi) e centrifugato per 60 min a 100000 *g* in un rotore Beckman SW55 Ti. Il supernatante ottenuto, è stato dializzato tutta la notte ad agitazione costante contro 20 volumi di tampone D (20 mM HEPES pH 7.9, 20% glicerolo, 100 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA), in tubi da dialisi aventi un *cut-off* di 12000 Da al fine di allontanare i sali. Infine il campione è stato centrifugato a 12000 *g* per 30 min e il supernatante ricavato è stato conservato in aliquote a -20 °C dopo averne misurato la concentrazione proteica.

2.3 Purificazione di EBP1

La proteina EBP1 è stata purificata essenzialmente secondo il protocollo di Monie [55]. Il plasmide di espressione (pETM-11) codificante l'isoforma più lunga (p48) della proteina EBP1, è stato fornito dal Prof. S. Curry. Il ceppo batterico XL1Blue MRF'Kan, trasformato con il plasmide pETM-11, è stato inoculato in 50 ml di terreno LB (10 gr di triptone, 5 gr di estratto di lievito, 10 gr di NaCl; pH 7.5), con kanamicina in concentrazione finale di 50ug/mL, per una notte a 37 °C, in agitazione. Quando l'assorbanza della coltura a 590 nm è risultata 0.5 OD/ml, è stata effettuata l'induzione con IPTG alla concentrazione finale di 1mM. La preparazione indotta, e 10 ml di coltura non indotta (recuperati in precedenza, come controllo) sono stati lasciati crescere tutta la notte a 37 °C in agitazione. L'avvenuta induzione è stata controllata mediante SDS-PAGE, e, confrontando i due campioni, indotto e non indotto, per la banda corrispondente alla proteina di interesse. La coltura batterica indotta è stata centrifugata a 6000 *g* per 10 min. Il

pellet batterico è stato lisato con 30 ml di tampone (50 mM HEPES, pH 7.0, 500 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoetanolo, 0.1% Triton X-100 e inibitori di proteasi) e sottoposto a sonicazione (16 cicli di 30' ON intervallati con 30' di pausa, a 10 A). A questo punto è stata effettuata una ultracentrifugazione a 50000 *g* per 20 min a 4°C. Il supernatante recuperato è stato purificato mediante cromatografia di affinità, utilizzando una resina al nichel (Qiagen) come segue.

La resina è stata equilibrata in tampone A (50 mM HEPES a pH 7.0, 500 mM NaCl, 5 mM β -mercaptoetanolo, 0.1% Triton X-100 e inibitori di proteasi). Gli estratti cellulari sono stati incubati con la resina per una notte in costante agitazione a 4°C. La resina, così preparata, è stata impacchettata in una piccola colonna (1x5 cm). Le proteine non legate alla colonna sono state allontanate, per gravità, con ripetuti lavaggi di tampone A. L'eluizione delle proteine affini alla resina, è stata condotta per mezzo di un gradiente discontinuo crescente di imidazolo in tampone A (50 mM, 100 mM, 250 mM). Per ognuno dei tre tamponi di eluizione, sono state raccolte 12 frazioni da 1.5 ml, ed è stata misurata l'assorbanza a 280 nm. Le frazioni proteiche eluite sono state dializzate in tampone: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT. 30 μ l di ciascuna frazione proteica sono stati analizzati mediante SDS-PAGE e saggi di legame alle sonde di nostro interesse.

2.4 Saggio colorimetrico per la determinazione della concentrazione proteica totale

La concentrazione proteica di campioni o standard di proteine è stata determinata per mezzo di saggi colorimetrici, secondo una metodica pubblicata

[56]. È stata preparata una retta di taratura, in base a soluzioni a concentrazione nota di BSA in TBS (20 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, pH 7,3): sono state utilizzate cinque soluzioni standard a concentrazione crescente (1, 2, 3, 4, 5 mg/ml). I campioni sono stati diluiti 1:10 in TBS e un'aliquota di 2 µl è stata aggiunta ad una miscela formata da 800 µl di H₂O e 200 µl reagente *BIO-RAD protein assay* (Bio-Rad). Il colore di tale reattivo passa dal rosso al blu in maniera proporzionale alla concentrazione proteica di ogni campione: l'intensità del cambiamento di colore, è stata rivelata, misurando spettrofotometricamente l'assorbanza a 595 nm. Dai valori di assorbanza ottenuti, grazie alla retta di taratura (costruita esprimendo l'assorbanza degli standard in funzione della diluizione) e tenendo conto delle diluizioni, è stata calcolata la concentrazione proteica dei campioni, in mg/ml.

2.5 Elettroforesi e *immunoblotting*

L'elettroforesi in condizioni riducenti e denaturanti (SDS-PAGE) è stata eseguita su gel discontinuo, sostanzialmente in accordo al metodo di Laemmli [57]. Per preparare il gel è stata utilizzata una soluzione madre di acrilamide e N,N'-metilenbisacrilammide, rispettivamente al 29 e 1% (Bio-Rad). Il gel di separazione, contenente 137 mM Tris-HCl a pH 8.8 e 0.1% SDS, è stato preparato ad una concentrazione di poliacrilammide di 12.5%; uno strato superiore di gel, costituito da 137 mM Tris-HCl a pH 6.8 e 0.1% SDS, è stato preparato ad una concentrazione di poliacrilammide di 6%. I gel sono stati polimerizzati, utilizzando, come catalizzatori, 50 µl di persolfato di ammonio al 10% e 5 µl di TEMED. Il TEMED catalizza la decomposizione dello ione persolfato con la produzione di un radicale libero, in tal modo viene catalizzata la reazione di polimerizzazione dei monomeri

di acrilammide. I campioni, preparati in un tampone riducente e denaturante (62.3 mM Tris-HCl a pH 8.6, 10% glicerolo, 5% β -mercaptoetanol, 0.3% blu di bromofenolo, 5% SDS), sono stati incubati a 100°C per 5 min e poi caricati sul gel. La corsa elettroforetica è stata effettuata utilizzando un tampone ottenuto sciogliendo 3 g di Tris, 14.4 g di glicina e 10 ml di 10% SDS in un litro di acqua, applicando inizialmente una corrente di 15 mA per favorire l'entrata dei campioni nel gel e in seguito una corrente costante di 30 mA per circa 90 min.

È stata utilizzata anche una miscela di standard colorati *Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers* (Amersham), costituita da proteine ricombinanti con peso molecolare compreso tra 225 kDa e 12 kDa.

Dopo elettroforesi il gel è stato immerso in una soluzione contenente 25% isopropanolo e 10 % acido acetico, allo scopo di fissare le proteine. Dopo circa 1 h, la soluzione di fissaggio è stata rimossa e sostituita con un'altra simile, contenente 0.25 % di colorante (*Coomassie Brilliant Blue R-250*). Dopo 1 h di colorazione il gel è stato decolorato mediante ripetuti lavaggi con 10% acido acetico. Il trattamento con colorante e fissativo sono stati omessi quando il gel doveva essere sottoposto a trasferimento su membrana (*Western Blotting*).

Il *Western Blotting* è stato effettuato, essenzialmente in accordo a un protocollo pubblicato [58]. Dopo l'elettroforesi, il gel e una membrana di PVDF (*Polyvinylidene fluoride*), precedentemente attivata in metanolo, sono stati equilibrati per 20 min in un tampone di trasferimento (20 mM Tris, 192 mM glicina, 10% metanolo, pH 8.3) a 4°C. Le proteine sono state trasferite sulla membrana mediante migrazione in campo elettrico usando lo strumento *Fastblot* (Whatman, Biometra). In particolare, la membrana è stata adagiata su 5 fogli di cellulosa a contatto con l'anodo; poi, sulla membrana è stato deposto il gel e, su di

esso, altri 5 fogli sono stati sovrapposti: i fogli, imbevuti di tampone, sono serviti per assicurare la continuità del campo elettrico. Il gel è stato trasferito applicando 160 mA per 45 min. Successivamente la membrana è stata lavata due volte con TBS-T (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) e incubata in una soluzione di TBS-T supplementata al 5 % con latte magro per 1 h a temperatura ambiente, per saturare eventuali siti aspecifici di legame all'anticorpo. Dopo due lavaggi in TBS-T, la membrana è stata incubata per 1 h a TA con l'anticorpo specifico per l'antigene, diluito in una soluzione TBS-T con 1 % di latte magro. La diluizione è stata fatta 1:1000 per l'anticorpo anti-EBP1 fatto in coniglio (Upstate Cell Signalling), 1:1000 per l'anticorpo anti-DRBP76 fatto in topo (Biosciences Pharmigen) oppure 1:20000 per l'anticorpo anti-Tubulina fatto in topo (Sigma). Dopo altri due lavaggi in TBS-T, la membrana è stata incubata per 1 h a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario specifico (fatto in coniglio o in topo) coniugato a perossidasi (Sigma). Infine la membrana è stata ancora lavata due volte in TBS-T. L'attività dell'enzima perossidasi, è stata rivelata, mediante l'aggiunta di una soluzione di perossido di idrogeno e della soluzione di sviluppo *ECL Western Blotting* (Amersham Biosciences), su lastre *Kodak-Fuji Medical X-Ray Film* (Fujifilm).

2.6 Cromatografia di affinità e a scambio anionico

La cromatografia di affinità è stata eseguita utilizzando una resina di eparina fissata a sefariosio, CL-6B (GE-Healthcare). La resina è stata rigonfiata in acqua distillata e poi equilibrata in tampone E (10 mM Hepes pH 7.5, 40 mM KCl, 3mM MgCl₂ e 5% glicerolo). Gli estratti cellulari sono stati incubati con la resina

per una notte in costante agitazione a 4°C. La resina, così preparata, è stata impacchettata in una piccola colonna ($V_{tot} = 3$ ml). Le proteine non legate alla colonna sono state allontanate, per gravità, con ripetuti lavaggi di tampone A. L'eluizione delle proteine affini alla resina è stata condotta per mezzo di un gradiente discontinuo crescente di KCl in tampone E (0.25 M, 0.5 M, 0.75 M e 1.0 M). Per ognuna delle quattro soluzioni di KCl (5 ml ciascuna) sono state raccolte 10 frazioni da 0.5 ml, ed è stata misurata l'assorbanza a 280 nm per monitorare l'eluizione delle proteine. Sono stati osservati due picchi di eluizione (*a* e *b*). Le frazioni proteiche eluite, appartenenti ai due picchi, sono state raccolte separatamente e dializzate in tampone: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT. 30 µg di ciascuna frazione proteica sono stati, analizzati in esperimenti di legame alle sonde di nostro interesse; poi le frazioni positive per il legame sono state raccolte in una miscela, che è stata frazionata con FPLC a scambio anionico (Mono Q) come segue.

La cromatografia a scambio anionico è stata eseguita in una colonna (1x5cm) (Pharmacia), e equilibrata con 10 volumi di tampone F (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT) e poi caricata con 2 ml di proteine (ottenute dal picco *b* della cromatografia di affinità, precedentemente trattata) a 0.2 ml/min. La colonna è stata, poi, abbondantemente lavata con il tampone 1 a 0.5 ml/min, per rimuovere il materiale non legato. Quando l'assorbanza a 280 nm nell'effluente è risultata ≤ 0.001 OD/ml, è stata effettuata l'eluizione con due gradienti lineari e crescenti di NaCl ad una velocità di flusso di 0.5 ml/min. Il primo gradiente è stato effettuato con un tampone da 0 a 0.5 M di NaCl in tampone F; il secondo gradiente con in tampone da 0.5 a 1 M di NaCl in tampone F.

2.7 Analisi NanoESI-MS/MS

Le frazioni eluite da FPLC sono state separate mediante elettroforesi SDS-PAGE. Il gel è stato trasferito su un filtro di PVDF che è stato successivamente esaminato con saggi di legame al trascritto sintetico 3-DRA (discussi in seguito). Le bande di interesse sono state escisse dal gel e digerite *in situ* con tripsina, usando la procedura descritta in *Protein Chip Technical note* (Bio-Rad). La miscela di peptidi è stata estratta dal gel e separata mediante nanoHPLC a fase inversa (Dionex-Ultimate 3000 Nano LC Systems). La rivelazione del materiale eluito è stata effettuata con nanoESI MS/MS, per mezzo di uno spettrometro di massa Q-TOF (Q-Star Elite; Applied Biosystems). I segnali ottenuti sono stati analizzati con appositi programmi di ricerca (i.e. Mascot) per l'identificazione di proteine nel database NCBIInr (umano). Sono stati presi in considerazione solo i peptidi con uno score > 41, che indicano, quindi, un'elevata omologia ($p < 0.05$).

2.8 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Per l'amplificazione dei frammenti di DNA 3-DRA, 3-DQA1 e 3-DRB1 corrispondenti, rispettivamente, alle regioni 3'UTR degli mRNA di HLA-DRA, HLA-DQA1 e HLA-DRB1, è stato utilizzato l'enzima *EuroTaq* DNA polimerasi (Euroclone). Come template sono stati adoperati plasmidi in cui erano stati clonati i cDNA *full-length* dei geni MHCII.

La reazione di amplificazione è stata allestita nelle stesse condizioni in tutti gli esperimenti, fatta eccezione per la temperatura di *annealing*, che cambia a seconda della coppia di oligonucleotidi adoperata. È stato eseguito un iniziale ciclo di denaturazione di 5 min a 95°C seguito da 36 cicli di amplificazione ognuno

costituito da tre fasi: denaturazione (30 sec a 94°C), *annealing* (30 sec a 60°C per i frammenti 3-DRA e 3-DQA1 e 62°C per 3-DRB1) e polimerizzazione (30 sec a 72°C). Dopo i 36 cicli è stato eseguito un ulteriore passaggio di 7 min a 72°C, per la completa estensione dei prodotti di amplificazione. Tutti gli oligonucleotidi sono stati progettati usando il software *Primer3* [59] disponibile sul web e sintetizzati dalla PRIMM. Gli oligonucleotidi che si legano sul filamento antisense sono stati progettati con “a monte” la sequenza del promotore T7, necessaria per la sintesi dei trascritti *in vitro*. Le sequenze degli oligonucleotidi sono riportate in tabella 1. Per la reazione di amplificazione è stata preparata una miscela contenente acqua (trattata per eliminare ogni contaminazione da RNasi), *buffer* di reazione 1X, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5 µM *primers* e 0.05 U di *Taq* polimerasi.

2.9 Purificazione dei prodotti di PCR

I frammenti ottenuti dalla PCR sono stati purificati mediante *Minelute PCR purification* Kit (Qiagen). Per la quantificazione del DNA in soluzione, l'assorbanza a 260 nm è stata misurata con lo spettrofotometro e la concentrazione dell'acido nucleico è stata calcolata con la formula: 1OD= 50 µg.

I prodotti amplificati sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1 % preparato in tampone TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA) a cui è stato aggiunto il colorante fluorescente bromuro di etidio ad una concentrazione finale di 0,5 µg/ml. I campioni sono stati preparati aggiungendo, ad un'aliquota del prodotto amplificato, 1/5 volume di *Loading Buffer* 6X (0.25% blu di bromofenolo, 0.25% xilene cianolo FF, 30% glicerolo). Come marcatore di peso molecolare, per misurare la lunghezza delle molecole nelle bande elettroforetiche,

è stato utilizzato il 100 *bp Ladder Mix* (MBI Promega). L'elettroforesi è stata condotta nel tampone TAE ad un voltaggio costante di 100 V per 30 min. Dopo l'elettroforesi il gel è stato osservato e fotografato al transilluminatore con luce UV (366 nm).

2.10 Trascrizione *in vitro* delle sonde a RNA

La reazione di trascrizione *in vitro* delle sonde a RNA, 3-DRA, 3DQA1 e 3-DRB1 è stata condotta utilizzando come templati i prodotti di amplificazione delle *subregioni* della 3'UTR degli mRNA MHCII precedentemente descritti.

Le sonde polinucleotidiche sono state sintetizzate *in vitro* in presenza di [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP adoperando il kit *Maxiscript T7* (Ambion) con una procedura di trascrizione basata sulla seguente miscela di reazione: acqua *RNasi-free* fino a 20 μl , *buffer* di trascrizione 1X, 0.5 mM NTP, 0.5 μg di DNA stampo, 0.5 U di RNA polimerasi T7, 2 μl [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP (800 Ci/mmol, 20 mCi/ml) (Amersham Bioscience). La miscela di reazione è stata incubata a 37°C per 60 min. Successivamente lo stampo di DNA è stato digerito con 0,5 U di *Turbo DNase* (Ambion) per 15 min a 37°C. Le molecole di RNA sintetizzate *in vitro* sono state purificate dai nucleotidi non incorporati, mediante filtrazione per esclusione molecolare, utilizzando le cartucce cromatografiche *Micro Bio-Spin P-30* (Bio-Rad). Un'aliquota di 10 μl di una diluizione 1:100 delle sonde marcate è stata analizzata al β -counter (Beckmann) per valutare la quantità di isotopo radioattivo incorporato.

Per eseguire gli esperimenti di competizione sono state preparate le sonde di RNA non marcate usando il kit *Megascript T7* (Ambion). È stato eseguito il protocollo suggerito di trascrizione *in vitro*, usando la seguente miscela di

reazione: acqua *RNasi-free* fino a 20 µl, *buffer* di trascrizione 1X, 7.5 mM NTP, 1µg di DNA stampo, 5 U di RNA polimerasi T7. La miscela è stata incubata a 37°C per 4 ore. Il DNA usato come stampo è stato digerito con 0,5 U di *Turbo DNase* (Ambion) per 15 min a 37°C. I trascritti sono stati purificati dai nucleotidi non incorporati utilizzando le cartucce cromatografiche *Micro Bio-Spin P-30* (Bio-Rad). Successivamente, i prodotti sono stati osservati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1,6 % in tampone TAE seguendo la procedura utilizzata per l'analisi dei prodotti di PCR precedentemente illustrata. Per la quantificazione dei trascritti in soluzione è stata misurata l'assorbanza a 260 nm; la concentrazione è stata ricavata applicando la seguente formula: $10D = 40 \mu\text{g}$.

2.11 Saggio di legame all'RNA (REMSA)

Per i saggi di legame delle proteine all'RNA sono stati utilizzati i trascritti marcati radioattivamente (3-DRA, 3-DQA1 e 3-DRB1). La reazione di *binding* tra tali sonde e gli estratti proteici è stata allestita come segue: 20 µg di proteine sono stati aggiunti a una soluzione di *Lysis Buffer* (10 mM HEPES pH 7.9; 3 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 5 % glicerolo, 1 mM DTT, inibitori di proteasi) per un volume finale di 20 µl; a tale miscela è stato aggiunto 1 µl di una diluizione (50.000 cpm/µl) del trascritto marcato. La miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 30 min. Dopo l'incubazione è stato aggiunto 1 µl (2U) dell'enzima Ribonucleasi T1 (di *Aspergillus oryzae*), al fine di degradare le parti non protette del trascritto complessato alle proteine; l'incubazione è proseguita per ulteriori 10 min a temperatura ambiente. Successivamente sono stati aggiunti 2 µl di eparina (50 mg/ml) ed è stata protratta l'incubazione per altri 10 min a temperatura ambiente.

Al termine dell'ultima incubazione sono stati aggiunti 10 μ l (25-50 % del volume finale della reazione) di *Loading Buffer* (30 mM Tris HCl pH 7.5, 40 % saccarosio, 0.2 % blu di bromofenolo) e si è proseguito al caricamento dei campioni sul gel. Allo scopo di evitare risultati falsi positivi, sono state effettuate anche due reazioni di controllo: una in assenza di estratto proteico e di RNasi T1, per esaminare l'integrità del trascritto marcato, e l'altra in assenza di estratto proteico ma in presenza di RNasi T1, per valutare la capacità degradativa di quest'ultima. L'avvenuta reazione di legame tra RNA ed estratto proteico è stata verificata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni non denaturanti e non riducenti.

Nei saggi di competizione sono stati utilizzati gli RNA, trascritti *in vitro* ma non marcati, di 3-DRA e 3-DQA1 e il polinucleotide poly-U, entrambi nelle quantità di 0.5 e 5 μ g. Essi sono stati incubati con l'estratto proteico, per 20 min, prima dell'aggiunta della sonda marcata.

Per valutare se le proteine EBP1 e NF90 erano tra quelle che legano le sonde marcate, sono stati eseguiti saggi di *supershift*. Aliquote di 0.5, 2 e 6 μ g di anticorpi, anti-EBP1 (Upstate Cell Signalling), anti-DRBP76 (Biosciences Pharmigen) oppure IgG di controllo (Sigma), sono stati incubati per 20 min con l'estratto proteico, prima dell'aggiunta della sonda marcata. Il legame degli anticorpi alle proteine, se presenti nel complesso di legame, infatti, generava un rallentamento della mobilità elettroforetica del complesso stesso.

Il gel di poliacrilammide, di dimensioni 20 x 20 cm e spessore 1,5 cm, è stato preparato utilizzando una miscela di acrilamide e N,N'-metilenbisacrilammide (al 29 e 1 % rispettivamente) diluita 1:5 in TBE 0,3X (13,5 mM Tris-borato, 0,3 mM EDTA) e acqua milliQ. Il gel è stato polimerizzato con 450 μ l persolfato di

ammonio al 10 % e 45 µl di N, N, N',N'- tetrametilen-diammina (TEMED). La corsa elettroforetica è stata condotta a 200 V costanti in TBE 0,3X. Dopo l'elettroforesi, il gel è stato trasferito su un foglio di cellulosa ed essiccato per 45 min mediante l'apparecchio *gel dryer*, collegato ad una pompa da vuoto. Per la quantizzazione delle bande è stato utilizzato l'apparecchio *PhosphorImager Typhoon* (Molecular Dynamics). Il gel è stato esposto in cassette *storage phosphor screen* (Amersham Biosciences) per una notte. Successivamente lo schermo è stato sottoposto a scansione da parte dell'apparecchio, e, per l'analisi, è stato utilizzato il programma *ImageQUANT*.

2.12 Saggio di legame all'RNA (*Northwestern Blot*)

I saggi di *Northwestern Blot* sono stati eseguiti per definire il pattern di interazione tra l'estratto proteico e la sonda ad RNA marcata, nonché, per avere informazioni circa il peso molecolare delle proteine. Anche per questi saggi sono stati utilizzate le sonde marcate di RNA 3-DRA, 3-DQA1 e 3-DRB1.

Per eseguire questa tecnica è stata effettuata dapprima un'elettroforesi degli estratti proteici (SDS-PAGE) e, poi, un elettrotrasferimento del materiale dal gel ad una membrana di PVDF, come descritto precedentemente. Dopo il trasferimento, quindi, la membrana è stata lavata due volte con tampone BB1 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) e, poi, è stata trattata con sei successive soluzioni a concentrazione decrescente di guanidina-HCl in BB1 (6 M, 3 M, 1.5 M, 0.75 M, 0.37 M e 0.18 M). Questo passaggio consente la denaturazione e, poi, una lenta rinaturazione delle proteine sulla membrana. È stata effettuata, poi, la procedura di blocco dell'adsorbimento aspecifico, incubando la membrana per 1

h in BB1 al 2,5 % di latte magro. Dopo 2 lavaggi con tampone BB1, la membrana è stata incubata con le sonde a RNA per 2 h in agitazione lenta. L'incubazione è stata condotta in 10 ml di tampone BB1 usando 150.000 cpm/ml (corrispondenti a circa 50-100 ng/ml) di RNA marcato e in presenza di 10 µg/ml di RNA di lievito, per saturare eventuali siti aspecifici di legame alle proteine immobilizzate sulla membrana. Infine la membrana è stata lavata due volte con tampone BB1. Tutti i passaggi di questo saggio sono stati condotti a TA. Per la rivelazione delle proteine legate alle sonde è stato usato il sistema *Typhoon* già descritto precedentemente.

2.13 Analisi al citofluorimetro

L'espressione in superficie dell'eterodimero HLA-DR, è stata determinata mediante analisi citofluorimetrica utilizzando il sistema *FACS ARIA cell-sorting* (Becton Dickinson) e il software DIVA (BD Biosciences). 4×10^5 cellule sono state lavate due volte con una soluzione di DPBS (Lonza) contenente 0,5% FCS (Gibco). Successivamente, le cellule, sono state risospese in 100 µl di acqua e incubate con 1µg di anticorpo anti-HLA-DR (BD Biosciences) coniugato con fluoresceina isotiocianato (FITC) per 30 min in ghiaccio. Per ogni anticorpo è stato utilizzato un appropriato controllo di isotipo FITC-IgG. Dopo due lavaggi in PBS, le cellule sono state analizzate al citofluorimetro .

2.14 Transfezione e silenziamento genico

Per gli esperimenti di transfezione, sono stati utilizzati 4 plasmidi, clonati nel vettore pSVK3: pDRA e pDRB1 (contenenti, rispettivamente, i cDNA completi degli

mRNA di HLA-DRA e HLA-DRB1, comprese le regioni 5'UTR e 3'UTR), pDRAΔ e pDRB1Δ (contenenti, rispettivamente, il cDNA completo dei messaggeri HLA-DRA e HLA-DRB1 comprese le regioni 5'UTR, ma mancanti delle 3'UTR). La transfezione in cellule di melanoma (linea M14) è stata eseguita utilizzando *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) in accordo con il protocollo della casa di produzione. In breve: 1×10^5 cellule sono state coltivate (come precedentemente descritto) in piastre da sei pozzetti e incubate a 37°C per 12 h prima della transfezione, allestita utilizzando 4 µg di ogni plasmide. Le cellule sono state raccolte da alcune piastre, dopo trattamento con tripsina, a 48 ore dalla transfezione per eseguire esperimenti di citofluorimetria; le cellule delle altre piastre sono state parimenti raccolte dopo 0, 24, 48 e 72 h, per l'estrazione degli RNA.

La transfezione degli siRNA per il silenziamento genico è stata effettuata con il kit *HiPerFect Transfection Reagent* (Qiagen), secondo le indicazioni della casa di produzione. Gli siRNA sono stati sintetizzati da Qiagen. Le sequenze bersaglio dei siRNA utilizzati sono mostrati nella tabella 1. Le condizioni specifiche di interferenza sono state definite in maniera tale da determinare la massima efficienza di silenziamento e la minima tossicità per le cellule. In breve: 3×10^5 cellule sono state coltivate in piastre da sei pozzetti e incubate a 37°C per 12 h prima della transfezione. La transfezione è stata allestita utilizzando una concentrazione di siRNA di 50nM. Le cellule sono state raccolte, dopo trattamento con tripsina, dopo 72 ore dalla transfezione per eseguire l'analisi citofluorimetrica, e, dopo 0, 24, 48 e 72 ore per l'estrazione dell'RNA.

2.15 Estrazione dell'RNA totale

L'estrazione degli RNA cellulari è stata effettuata con il *Qiazol Lysis Reagent* (Qiagen), una soluzione di guanidina tiocianato e fenolo, che consente in un unico passaggio di lisare le cellule e di separare l'RNA dal DNA e dalle proteine.

Le cellule, previo trattamento con tripsina, sono state lavate due volte con DPBS e risospese in 0.5 ml di reagente e 100 µl di cloroformio. Dopo agitazione, la miscela è stata centrifugata 5 min a 13000 *g* e, una volta recuperata la fase acquosa contenente l'RNA, l'acido nucleico è stato precipitato con 0.8 volumi di alcool isopropilico. La miscela è stata agitata vorticosamente per 10 sec e centrifugata per 30 min a 13000 *g*. Una volta allontanato il supernatante, il *pellet* è stato lavato con etanolo al 75% , essiccato e risospeso in acqua RNasi-free. Al campione è stato aggiunto 1 volume di fenolo pH 4.3/cloroformio isoamilico (1:1) (Sigma); successivamente, la miscela è stata emulsionata per 30 sec e centrifugata per 5 min a 13000 *g*. La fase acquosa è stata recuperata e trasferita in nuovi tubi. Al campione sono stati aggiunti 2,5 volumi di etanolo al 100%, 1/10 volumi di acetato di sodio 3M e 5 µg di glicogeno. Il campione è stato conservato a -20°C per la notte e, successivamente, centrifugato per 30 min a 13000 *g*. Una volta allontanato il supernatante, il *pellet* è stato essiccato e risospeso in acqua RNasi-free.

Dopo purificazione, l'integrità e la purezza dell'RNA ottenuto sono state verificate mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.6% (come descritto precedentemente), e confronto con l'integrità delle due bande degli RNA ribosomali 18S e 28S.

2.16 Preparazione del cDNA e analisi per *Real time* PCR quantitativa

Il cDNA è stato preparato attraverso una reazione di retrotrascrizione utilizzando il *Quantitect* RT Kit (Qiagen) seguendo il protocollo della casa produttrice. 0.5 µg di RNA totale, in un volume finale di 12 µl di acqua RNasi-free, sono stati incubati con 2 µl di gDNA *Wipeout Buffer* 7X per 2 min a 42°C. Tale passaggio consente l'eliminazione del DNA genomico, se presente nei campioni di RNA di partenza. Successivamente sono stati aggiunti: 4 µl di *Quantiscript RT Buffer* 5X, contenente i dNTP, 1 µl di RT *Primer Mix*, contenente una miscela di *random primer*, e infine, 1 µl di enzima *Quantiscript Reverse Transcriptase*. Il campione, così preparato, è stato incubato a 42°C per 30 min e successivamente a 95°C per 3 min per inattivare l'enzima. Un centesimo del cDNA così ottenuto è stato usato come template per ciascuna PCR. Tutte le reazioni di *Real Time* PCR (qRT-PCR) sono state effettuate utilizzando 12,5 µl di *SYBER Green Supermix* 2X (Bio-Rad) contenente dNTP, DNA polimerasi e fluoresceina, in soluzione fisiologica, in presenza di 0.2 µM di oligonucleotidi specifici, in un volume finale di 25 µl. La reazione di amplificazione è stata realizzata usando il termociclatore *DNA Engine Opticon RT-PCR Detection System* (Bio-Rad), e allestita nelle medesime condizioni in tutti gli esperimenti, fatta eccezione per la temperatura di *annealing*, differente a seconda della coppia di *primers* utilizzata. Sono state utilizzate le seguenti condizioni: un ciclo a 95°C per 3 min per attivare l'enzima, seguito da 45 cicli di amplificazione (94°C per 15 sec, 55-60°C per 20 sec e 72°C per 20 sec). Tutte le coppie di *primers* sono state progettate in maniera da essere presenti in due esoni diversi (separati da almeno un introne); le loro sequenze sono riportate

in tabella 1. Ogni campione è stato amplificato in triplicato e ciascun esperimento di PCR conteneva due controlli negativi. La presenza del prodotto di PCR è stata confermata come una singola banda, del peso molecolare atteso, su gel di agarosio. La quantizzazione relativa dell'mRNA è stata calcolata utilizzando il metodo comparativo del ciclo soglia (Ct, *threshold cycle*) [60]. La normalizzazione è stata fatta basandosi sulla quantità dell'mRNA della β -actina. Il valore di espressione di un determinato trascritto viene espresso come $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dove $-\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ del campione sperimentale} - Ct \text{ della } \beta\text{-actina}) - (Ct \text{ del campione di riferimento} - Ct \text{ della } \beta\text{-actina del campione di riferimento})$. Il ciclo soglia viene definito come il numero di cicli in corrispondenza del quale la quantità di amplificato raggiunge una soglia prefissata. La quantizzazione assoluta, espressa in numero di copie del trascritto, è stata effettuata mediante l'utilizzo di standard specifici. Gli standard consistono in amplificati di circa 200 nucleotidi ottenuti per PCR utilizzando gli stessi oligonucleotidi usati per qRT-PCR. Degli standard è stato calcolato il numero di copie per un determinato volume ed è stato effettuato un esperimento di qRT-PCR con diluizioni seriali che vanno da 1×10^6 copie a 1 copia per campione amplificato. In questo modo si ottiene una curva standard, dalla quale, per interpolazione, si ricavano le quantità dei diversi trascritti. Dopo aver calcolato il numero di copie di ciascuna isoforma, il valore ottenuto è stato normalizzato rispetto al valore di espressione dell'mRNA codificante la gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) o la β -actina.

2.17 Saggi di stabilità mediante l'uso dell'Actinomicina D

Sono stati eseguiti saggi per misurare l'emivita di un trascritto (saggi di stabilità) utilizzando l'Actinomicina D che, legandosi selettivamente alla doppia elica del DNA, interferisce con l'azione di enzimi coinvolti nel processo di replicazione e trascrizione. 5×10^5 cellule sono state coltivate in piastre da sei pozzetti e incubate a 37°C per la notte. Le cellule sono state trattate con 10 µg/ml di Actinomicina D (Sigma), diluita nel terreno di coltura, e, a diversi tempi di incubazione (0h, 2h, 4h, 6h), sono stati isolati gli RNA. La variazione degli mRNA è stata valutata in esperimenti di qRT-PCR.

Oligonucleotidi usati per PCR

<i>Sonda</i>	<i>Primers</i>	<i>Sequenza 5'-3'</i>
3-DRA 403 bp	3DRAT7 3DRAR	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> ACATGGAGGTGATGGTGTTC TTCCACCCAAGATCATCAAA
3-DQA1 202 bp	3DQA1T7 3DQA1R	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> CCATCCTGGAAGGGAAGTG TCAGGAGGTCAGGGAAAGAA
3-DRB1 308 bp	3DRB1T7 3DRB1R	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> TGGACTTCAGCCAACAGGAT CTCAGCATCTTGCTCTTGTGCAG
La sequenza sottolineata rappresenta il promotore T7		

Sequenze bersaglio dei siRNA

siEBP1	5' TCCCACCAGCATTTTCGGTAAA 3'
siNF90	5' GCCCACCTTTGCTTTTTAT 3'
siDRA	5' CAGGAATCATGGGCTATCAAA 3'
siDRB1	5' CCTGGACAGATACTTCTATAA 3'

Oligonucleotidi usati per Real time PCR quantitativa

<i>Trascritto</i>	<i>Primers</i>	<i>Sequenza 5'-3'</i>
b-Actina	ACT-F ACT-R	TCATGAAGTGTGACGTTGACA CCTAGAAGCATTTCGGGTGCAC
GAPDH	G-F G-R	AACGGATTTGGTCGTATTGGGC TCGCTCCTGGAAGATGGTGATG
HLA-DRA	DRA-F DRA-R	GGACAAAGCCAACCTGGAAA AGGACGTTGGGCTCTCTCAG
HLA-DRB1	DRB1-F DRB1-R	CTCAGCATCTTGCTCTTGTGCAG CAGCATTAAAGTCAGGTGGTTCC
HLA-DQA1	DQA1-F DQA1-R	GGTGTAACCTTGTACCAGT GGAGACTTGGAACAACT
HLA-A-B-C	MHCI-F MHCI-R	CTCAGCATCTTGCTCTTGTGCAG ATGTAATCCTTGCCGTCGTA
EBP1	EBP1-F EBP1-R	CTGCACGCCAATAGAAGG AGTAAACGGCATGGCATCA
DRBP76/NF90	NF90-F NF90-R	CTGGTGCTGCTGTGTAAGGA AGGGACAATGGAGGCTCTTT

Tabella 1. Oligonucleotidi utilizzati per amplificazioni di PCR, per silenziamento genico e per la quantizzazione degli mRNA in esperimenti di qRT-PCR.

3 RISULTATI

3.1 Identificazione di proteine con attività di legame agli mRNA codificanti gli antigeni MHC di classe II

Un primo approccio allo studio del legame tra estratti proteici e le sonde marcate corrispondenti alla regione 3'UTR degli mRNA MHCII è stato descritto in letteratura [52]. Un'analisi fine della regione 3'UTR degli mRNA HLA-DRA e HLA-DQA1 fu eseguita dagli autori e diverse sonde a RNA marcate (di lunghezza variabile) furono trascritte *in vitro* per realizzare saggi di legame ad estratti citoplasmatici e nucleari da cellule di linfoma B (cellule Raji, una linea cellulare APC professionale), definendo il sito minimo di legame delle suddette sonde MHCII. Al fine di studiare anche la specificità tissutale, nei saggi di legame all'RNA è stata utilizzata anche una linea derivata da un melanoma primario umano (chiamata M14), che è una linea cellulare APC non professionale. Tale linea, caratterizzata da una bassa espressione costitutiva di molecole MHCII [3], ha consentito di apprezzare meglio le variazioni nell'espressione di queste molecole in seguito ad esperimenti di transfezione o silenziamento (discussi nei paragrafi successivi).

Mediante saggi di legame all'RNA è stato dimostrato che le regioni 3'UTR dei trascritti MHCII legano proteine a localizzazione citoplasmatica sia da cellule Raji sia dalla linea M14. Al fine di caratterizzare le proteine del complesso di legame, il passo successivo è stato, quindi, quello di purificare l'estratto citoplasmatico S100, dapprima mediante una cromatografia di affinità e, in seguito, con una a scambio ionico. Le proteine ottenute dalla seconda cromatografia sono state, quindi, separate per SDS-PAGE e analizzate nuovamente in saggi di legame all'RNA

(*Northwestern*). Le proteine di interesse sono state, quindi, recuperate dal gel e identificate mediante analisi di spettrometria di massa.

3.1.1 Saggi di attività di legame delle sonde marcate di RNA 3-DRA, 3-DQA1 e 3-DRB1 con estratti citoplasmatici

Per eseguire i saggi di legame all'RNA sono state utilizzate tre sonde polinucleotidiche: 3-DRA (403 nucleotidi), 3-DQA1 (202 nucleotidi) e 3-DRB1 (308 nucleotidi), derivanti dalle regioni 3'UTR degli RNA messaggeri di HLA-DRA, HLA-DQA1 e HLA-DRB1 (Figura 5). Le sonde sono state sintetizzate *in vitro* in presenza di [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP, utilizzando templati sintetizzati per PCR. I templati sono stati ottenuti mediante amplificazione di *subregioni* della regione 3'UTR dei cDNA *full-length*, utilizzando oligonucleotidi specifici, dei quali, quello a monte, contiene il promotore per l'RNA polimerasi T7.

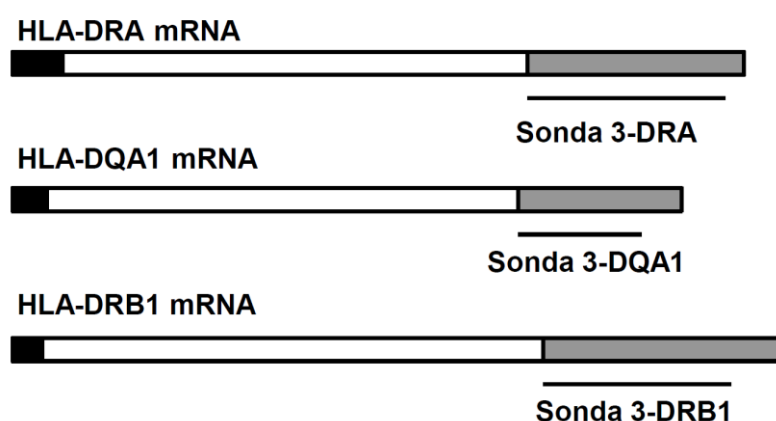


Figura 5. Rappresentazione schematica degli mRNA MHCII e delle sonde a RNA trascritte *in vitro*. Sono mostrati gli RNA messaggeri HLA-DRA, HLA-DQA1 e HLA-DRB1: la regione 5'UTR, la regione codificante e la regione 3'UTR, sono rispettivamente indicate in nero, bianco e grigio. Le sonde a RNA trascritte *in vitro* sono state progettate all'interno della regione 3'UTR, come mostrato in figura.

Due tipi di saggi di legame dell'RNA sono stati eseguiti: REMSA (RNA *Electrophoretic Mobility Shift Assay*), in cui il legame fra l'estratto proteico e la sonda a RNA marcata è analizzato mediante elettroforesi in condizioni non denaturanti, e *Northwestern Blot*, un tipo di saggio in cui l'RNA marcato è incubato con una membrana di PVDF su cui, precedentemente, sono state trasferite le proteine separate mediante elettroforesi SDS-PAGE. Questo tipo di saggio, diversamente dalla metodica REMSA, che non consente di avere informazioni sui fattori leganti gli RNA, permette la determinazione del numero e del peso molecolare delle proteine coinvolte nel complesso di legame.

Gli esperimenti di legame REMSA (Figura 6), hanno fornito una dimostrazione diretta dell'interazione tra proteine presenti nell'estratto citoplasmatico S100 (ottenuto da cellule M14) e le sonde 3-DRA e 3-DQA1, mostrando, per entrambe, l'esistenza di complessi di legame con la stessa mobilità elettroforetica. In contrasto, non è stato evidenziato alcun complesso di legame tra l'estratto S100 e la sonda 3-DRB1.

Sono stati effettuati anche saggi REMSA di competizione, in cui l'estratto citoplasmatico S100 è stato pre-incubato, prima dell'aggiunta della sonda marcata, con i trascritti non marcati 3-DRA, 3-DQA1 oppure con l'omopolimero poly-U. Sono state usate due quantità diverse di competitore: 0,5 e 5 µg. Gli esperimenti di competizione hanno dimostrato che il complesso di legame della sonda 3-DRA è stato spiazzato completamente quando era presente nella reazione di *binding* il trascritto 3-DQA1. Analogamente, anche la sonda 3-DQA1 perdeva la capacità di legare l'estratto proteico, se esso era stato preincubato con l'RNA non marcato 3-DRA. Allo stesso modo, anche il polinucleotide poly-U è risultato in grado di inibire la formazione del complesso di legame per entrambe le sonde.

Questi risultati hanno permesso di concludere che le medesime proteine interagiscono con le regioni 3'UTR di due diversi mRNA di MHCII. Il risultato degli esperimenti di competizione con il poly-U, avvalorava l'ipotesi che alcune proteine dell'estratto, coinvolte nel legame con le sonde, abbiano affinità per questo polinucleotide e vengano perciò da esso sequestrate. In letteratura sono descritte molte *RNA binding proteins* in grado di legare sequenze ricche in AU o CU; sebbene l'analisi della sequenza della regione 3'UTR degli mRNA di MHCII non abbia messo in luce canonici regioni o domini di legame proteico all'RNA, la sequenza primaria di tali trascritti è ricca di sequenze AUUUA (ARE) e zone *CU-rich* che potrebbero essere indispensabili nel legame alle proteine. Inoltre, è anche plausibile che, oltre alla sequenza primaria, anche le strutture secondarie dei trascritti possano avere un ruolo nell'interazione con le proteine [61].

Al fine di avere un'ulteriore evidenza dell'interazione delle sonde MHCII con gli estratti proteici, sono stati eseguiti esperimenti di *Northwestern Blot*. Per investigare sulla specificità tissutale i saggi di legame all'RNA sono stati effettuati su estratti proteici S100, ottenuti sia da cellule Raji sia da cellule M14, adoperando le stesse sonde già menzionate negli esperimenti REMSA: 3-DRA, 3-DQA1 e 3-DRB1. I risultati in Figura 3 mostrano che le sonde 3-DRA e 3-DQA1 presentano lo stesso profilo di legame con estratti Raji e M14. In aggiunta, la sonda 3-DRB1, che negli esperimenti REMSA non ha mostrato alcun complesso di legame con l'estratto proteico, in questo tipo di saggio mostra un profilo di legame simile alle altre due sonde.

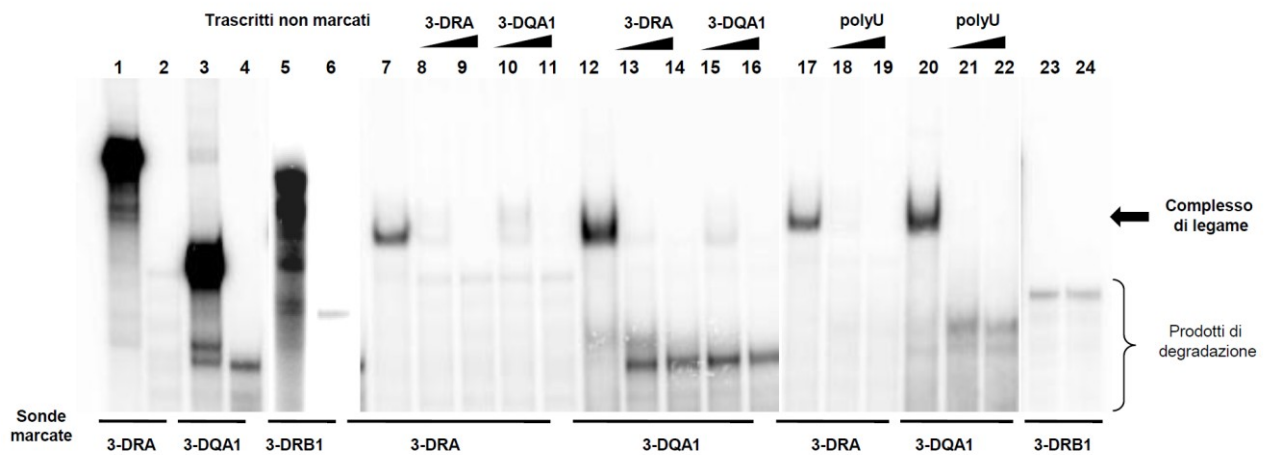


Figura 6. La 3'UTR dei messaggeri MHCII lega estratti citoplasmatici in saggi REMSA. Saggi REMSA eseguiti con le sonde marcate 3-DRA, 3-DQA1 e 3-DRB1 (rispettivamente, corsia 1, 3 e 5). Le corsie 2, 4 e 6 mostrano la digestione delle sonde trattate con RNasi T1. Gli estratti citoplasmatici, dalla linea di melanoma M14, formano un complesso di legame con la sonda 3-DRA (corsie 7 e 17) e con la sonda 3-DQA1 (corsie 12 e 20). Non è mostrato alcun complesso con la sonda 3-DRB1 (corsie 23 e 24). Il complesso di legame della sonda 3-DRA è spiazzato usando 0.5 e 5 μ g di trascritti non marcati 3-DRA (corsie 8 e 9) e 3-DQA1 (corsie 10 e 11) e 0.5 e 5 μ g di polinucleotide poly-U (corsie 18 e 19). Analogamente il complesso di legame della sonda 3-DQA1 è spiazzato usando 0.5 e 5 μ g di trascritti non marcati 3-DRA (corsie 13 e 14) e 3-DQA1 (corsie 15 e 16) e 0.5 e 5 μ g di polinucleotide poly-U (corsie 21 e 22).

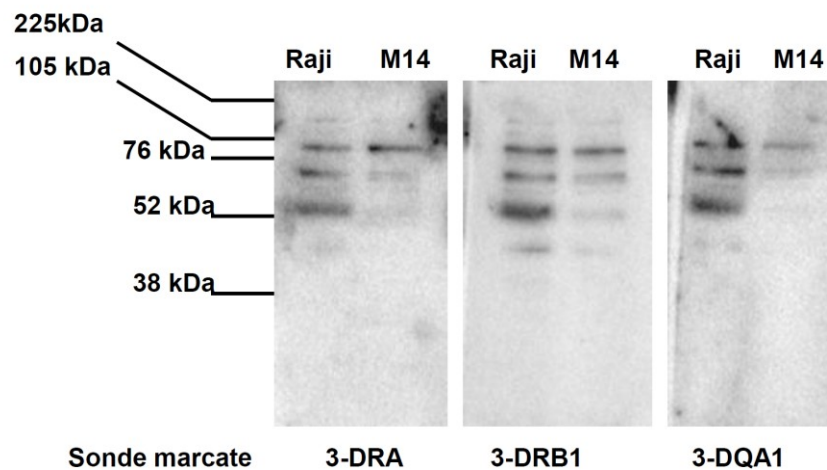


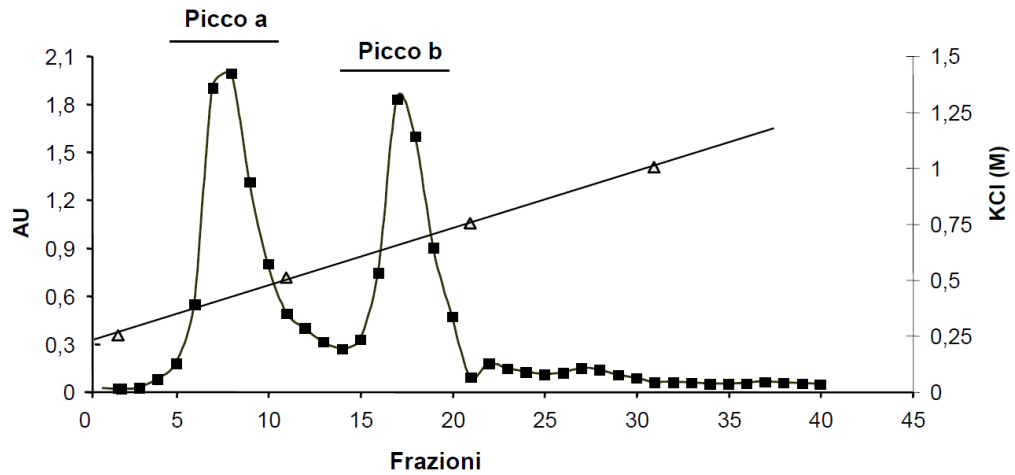
Figura 7. La 3'UTR dei messaggeri MHCII lega estratti citoplasmatici in saggi *Northwestern blot*. Estratti S100 ottenuti dalla linea di linfoblastoma B, Raji, e, dalla linea di melanoma, M14, sono stati separati mediante SDS-PAGE e trasferiti su filtri di PVDF. I filtri sono stati usati per saggi *Northwestern* con le sonde marcate 3-DRA, 3-DQA1 e 3-DRB1. I marcatori di peso molecolare sono indicati a sinistra.

3.1.2 Purificazione e identificazione delle proteine

Al fine di caratterizzare le proteine incluse nel complesso di legame, si è pensato di purificare parzialmente gli estratti mediante cromatografia di affinità per eparina (Figura 8, pannello A). Si è scelto questa resina perché la struttura polianionica dell'eparina si comporta come un analogo del DNA e dell'RNA e permette la purificazione di molti tipi di proteine che interagiscono con gli acidi nucleici. Sono stati utilizzati estratti citoplasmatici S100 ottenuti dalla linea Raji.

Le proteine legate alla colonna di eparina sono state eluite mediante un gradiente crescente di KCl e di ogni frazione è stata misurata l'assorbanza a 280 nm; un profilo a due picchi (*a* e *b*) è risultato nel cromatogramma (Fig. 8, A). Tutte le frazioni proteiche ottenute sono state analizzate in esperimenti di *Northwestern* utilizzando la sonda 3-DRA; quelle risultate positive appartenevano essenzialmente al picco *b*. Il gel colorato con *Coomassie*, ottenuto dopo SDS-PAGE di queste frazioni, mostrava un profilo ancora denso di proteine, per cui si è pensato di purificare ulteriormente i campioni positivi mediante FPLC. Pertanto le frazioni proteiche appartenenti al picco *b*, sono state dializzate e, poi, caricate su una colonna Mono Q (Fig. 8, pannello B). L'eluizione della colonna è stata compiuta con un gradiente lineare crescente di NaCl e ogni frazione è stata nuovamente saggiata per l'attività di legame all'RNA.

A



B

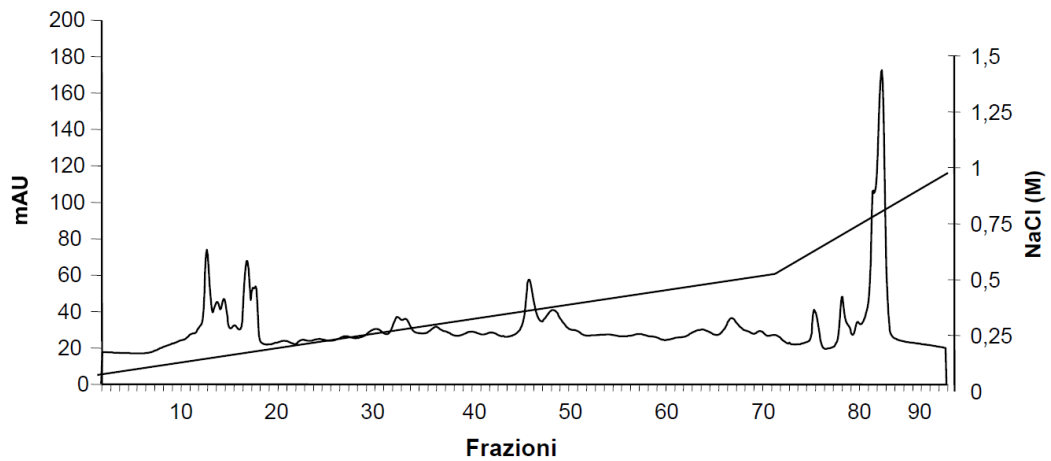


Figura 8. Purificazione delle proteine leganti gli RNA messaggeri MHCII.

Pannello A: profilo di eluizione della cromatografia di affinità per l'eparina. Gli estratti citoplasmatici S100, da cellule Raji, sono stati frazionati da una resina sefarosio coniugato ad eparina. L'eluizione è avvenuta mediante quattro tamponi di KCl a concentrazione crescente (0.25 M, 0.5 M, 0.75 M e 1.0 M).

Pannello B: profilo di eluizione della cromatografia a scambio anionico effettuata sulle frazioni del picco b ottenute dalla cromatografia di affinità. Le proteine sono state eluite con due gradienti lineari di NaCl (rispettivamente, da 0 a 0.5 M di NaCl, e, da 0.5 a 1 M di NaCl).

I saggi di *Northwestern* con le sonde 3-DRA e 3-DRB1 sono stati effettuati su tutte le frazioni ottenute dalla cromatografia a scambio anionico. Di esse, due frazioni (37 e 56), hanno mostrato ancora attività di legame alle sonde (Figura 9, pannello A), poiché sono state rilevate due bande proteiche con massa molecolare apparente di 50 e 76 kDa.

Le bande di interesse sono state, quindi, separate mediante elettroforesi SDS-PAGE (Figura 9, pannello B), escisse dal gel e digerite *in situ* con tripsina; i peptidi sono stati estratti, separati mediante HPLC ed analizzati con NanoESI-MS/MS (Q-Star Elite). Le proteine sono state identificate ricercando le sequenze dei peptidi (Tabella 2) nel database NCBIInr (umano).

La banda proteica con una massa molecolare apparente di 50 kDa è stata identificata come EBP1 (*Erb3 receptor-binding protein*); mentre la banda proteica con una massa molecolare apparente di 76 kDa è stata identificata come DRBP76 (*double-stranded RNA-binding Nuclear Protein*) conosciuta anche come NF90 (*Nuclear Factor 90*). I dati sono stati confermati da saggi di *Western blot* con anticorpi specifici (Fig. 9, pannello C).

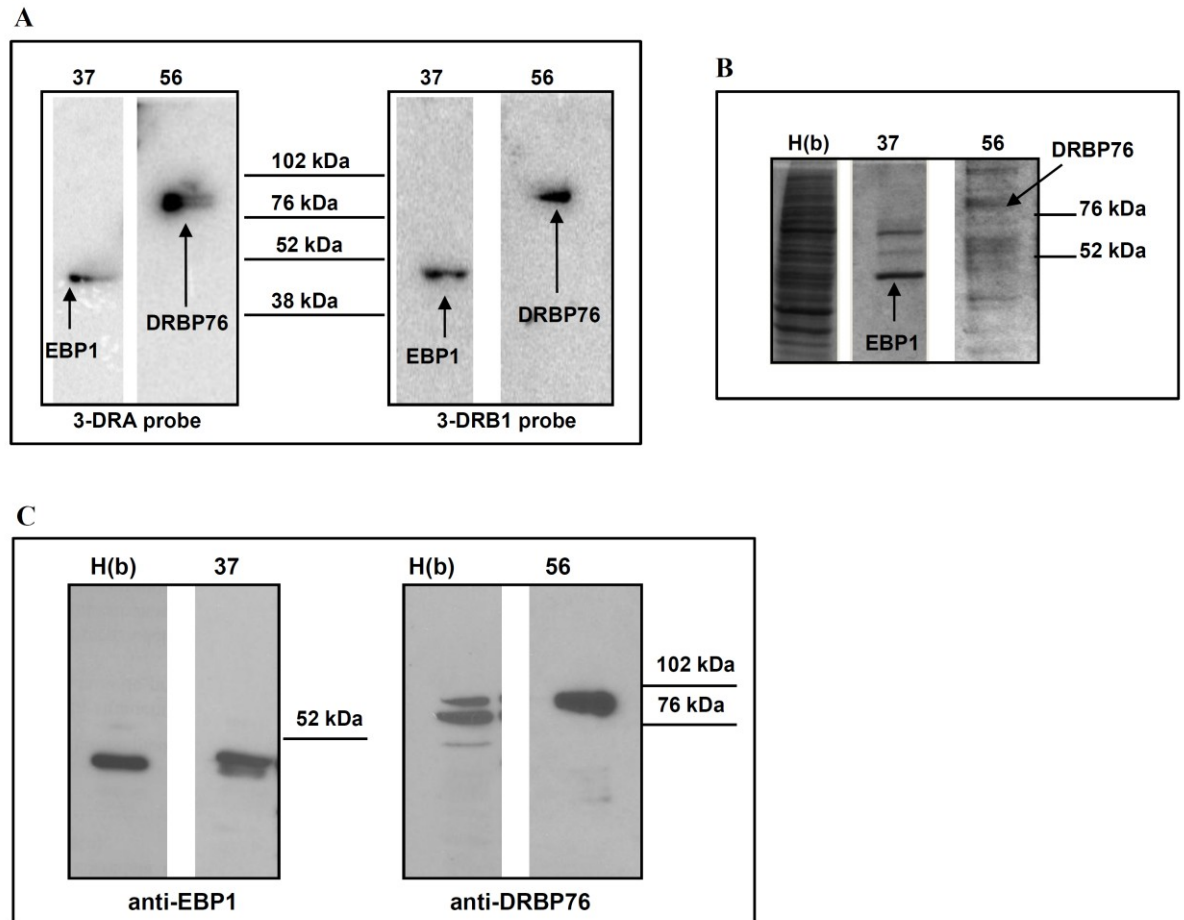


Figura 9. Identificazione delle RNA binding proteins.

Il *pool* della frazione del picco b della cromatografia di eparina, indicato come H(b), e le frazioni 37 e 56 della cromatografia a scambio anionico, sono state separate mediante SDS-PAGE, i gel sono stati trasferiti su filtri di PVDF.

Pannello A: saggio di *Northwestern Blot* eseguito con le sonde 3-DRA e 3-DRB1. Le proteine che hanno attività di legame all'RNA sono indicate. I marcatori di peso molecolare sono mostrati al centro.

Pannello B: il gel, dopo trasferimento su un filtro di PVDF, è stato colorato con *Coomassie*. Le proteine indicate, sono state escisse dal gel e analizzate per spettrometria di massa. I marcatori di peso molecolare sono mostrati sul lato destro.

Pannello C: i filtri PVDF sono stati analizzati per *Western blotting* con gli anticorpi anti-EBP1 e anti-NF90. Sulla destra, sono mostrati i marcatori di peso molecolare.

Identificazione di EBP1		
Peptidi identificati	Massa	Posizione amminoacidica
SDQDYILK	9.804.815	93-100
LVKPGNQNTQVTEAWNK	19.259.959	155-171
TIIQNPTDQQK	12.846.674	199-209
AFFSEVER	9.834.712	263-270
FDAMoxPFTLR	11.125.325	271-280
RFDAMoxPFTLR	12.686.336	270-280
HELLQPFNVLYEKEGEFVAQFK	26.823.693	298-319
HELLQPFNVLYEK	16.288.562	298-310
EGEFVAQFK	10.535.131	311-319
FTVLLMPNGPMR	14.067.050	320-331
FTVLLMoxPNGPMoxR	14.067.050	320-331
ITSGPFEPDLYK	13.656.816	332-343
SEMoxEVQDAELK	12.935.758	344-354
ALLQSSASRK	9.315.087	355-364
Identificazione di DRBP76/NF90		
Peptidi identificati	Massa	posizione amminoacidica
LFPDTPLALDANK	14.137.504	49-66
SSELEQYLQR	12.516.095	427-436
VLGETLSVNDPPDVLDR	19.089.793	458-470

Tabella 2. Peptidi identificativi delle proteine EBP1 e NF90. Le proteine sono state identificate ricercando le sequenze dei peptidi nel database NCBIInr (umano).

3.1.3 Analisi del complesso di legame

Per dimostrare che le proteine EBP1 e DRBP76/NF90 sono incluse nel complesso ribonucleoproteico (RNP) che lega gli mRNA MHCII, abbiamo eseguito un saggio REMSA in cui, prima dell'aggiunta della sonda marcata, l'estratto proteico è stato incubato con anticorpi anti-EBP1 e anti-DRBP76.

Quando è stato usato l'anticorpo anti-DRBP76, a conferma della presenza della proteina NF90 nel complesso RNP entrambe le sonde 3-DRA e 3-DQA1 hanno mostrato una banda di legame che migrava più lentamente se confrontata con il campione senza anticorpo o con un campione in cui, come controllo, sono state aggiunte IgG di topo, dato che l'anticorpo anti-DRBP76 era prodotto in topo (Figura 10).

Tuttavia quando nell'esperimento REMSA, è stato usato l'anticorpo anti-EBP1, non è stata osservata alcuna variazione nella mobilità elettroforetica del complesso di legame. Presumibilmente, ciò è dovuto ad una interazione molto debole tra l'anticorpo e la proteina EBP1.

Per dimostrare, quindi, il coinvolgimento della proteina EBP1 nell'interazione con gli mRNA per MHCII, abbiamo pensato di purificare la proteina EBP1 ricombinante per poter eseguire dei saggi di legame all'RNA. Una volta ottenuta, è stata controllata mediante SDS-PAGE (Figura 11, pannello A), e, successivamente, saggiata in esperimenti di *Northwestern Blot* (Figura 11, pannello B) dove ha mostrato chiaramente affinità di legame alle sonde 3-DRA e 3-DQA1.

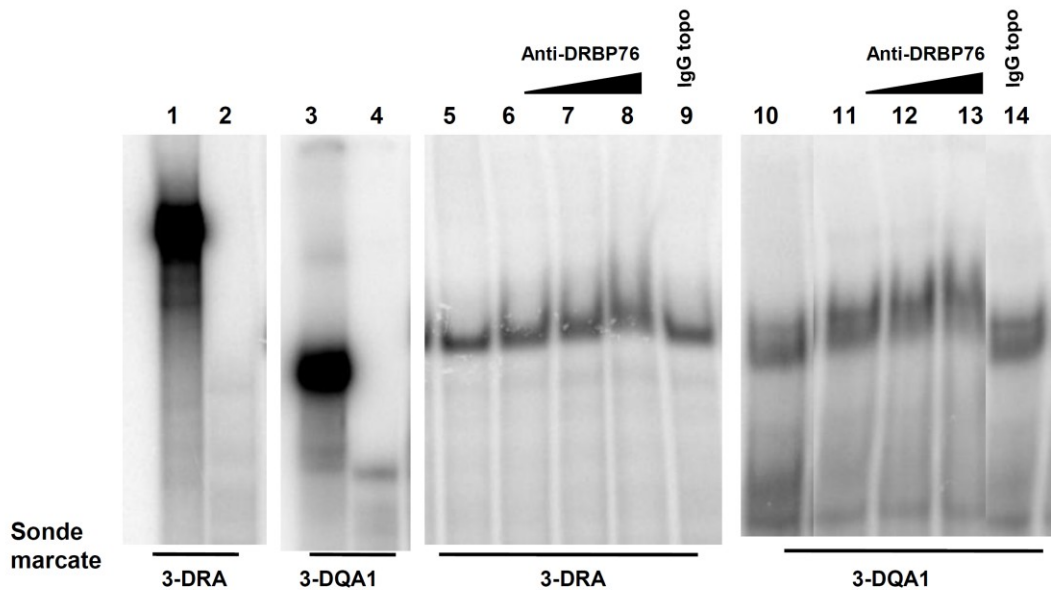


Figura 10. Analisi del complesso ribonucleoproteico che lega la regione 3'UTR degli mRNA per MHCII. I saggi REMSA sono stati eseguiti con le sonde marcate 3-DRA e 3-DQA1 (rispettivamente corsia 1 e 3). Le corsie 2 e 4 mostrano le sonde digerite con RNasi T1. La corsia 5 mostra il complesso di legame tra l'estratto citoplasmatico S100, da cellule M14, e la sonda 3-DRA. Le corsie 6, 7, 8, mostrano un complesso di legame, dello stesso estratto, con la sonda 3-DRA, che migra più lentamente se nella reazione di *binding* sono usati, rispettivamente, 0.5, 2, e 6 µg di anticorpo anti-DRBP76. In presenza di IgG di topo, usate come controllo (corsia 9), non si osserva una variazione nella migrazione del complesso. Ugualmente accade per la sonda marcata 3-DQA1. Nella corsia 10 è mostrato il complesso di legame tra l'estratto S100 da M14 e la sonda, in assenza di anticorpo; nelle corsie 11, 12 e 13 è mostrato il profilo elettroforetico dell'estratto trattato, rispettivamente, con 0.5, 2, e 6 µg di anticorpo anti-DRBP76; il complesso di legame è ritardato. Non è mostrata variazione di migrazione del complesso quando nella reazione sono usate IgG di topo (corsia 14).

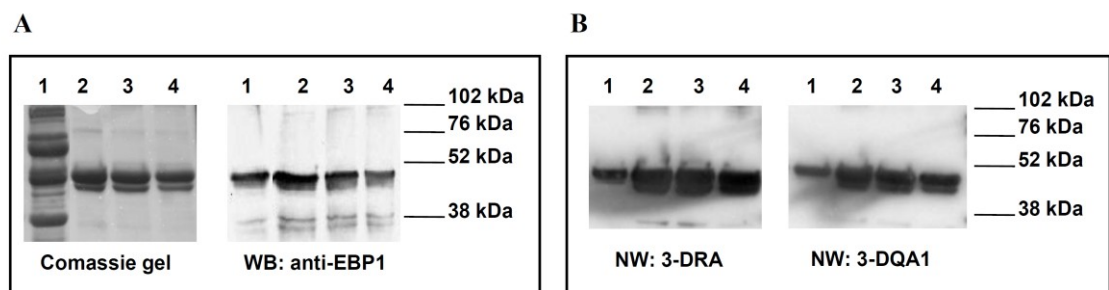


Figura 11. Analisi della proteina EBP1 ricombinante. L'estratto proteico di *E. coli* esprime EBP1 (corsia 1) e tre frazioni diverse ottenute dalla colonna di affinità usata per la purificazione della proteina EBP1 (corsie 2, 3 e 4), sono state separate mediante SDS-PAGE e trasferite su un filtro di PVDF. Pannello A: gel colorato con *Coomassie*, e membrana PVDF esaminata per *Western blot* (WB) con l'anticorpo anti-EBP1. Pannello B: membrane di PVDF (su cui sono state trasferite le frazioni) sono state saggiare in esperimenti di legame all'RNA, mediante saggio *Northwestern* (NW) con le sonde marcate 3-DRA e 3-DQA1. Le migrazioni dei marcatori di peso molecolare sono indicate sulla destra.

3.2 Modulazione dell'espressione dei messaggeri MHCII in seguito al silenziamento degli mRNA codificanti le proteine EBP1 e NF90

Dopo aver identificato le proteine EBP1 e NF90 appartenenti al complesso di legame che interagisce con la regione 3'UTR degli mRNA per MHCII, gli esperimenti successivi sono stati indirizzati ad indagare sul loro ruolo funzionale. Abbiamo analizzato l'effetto della riduzione della quantità di queste proteine (realizzata con esperimenti di silenziamento genico), sull'espressione dei trascritti per MHCII e sulla loro stabilità. Gli esperimenti di silenziamento genico sono stati eseguiti in cellule di melanoma M14, una linea caratterizzata da una bassa espressione costitutiva delle molecole MHCII, tale da consentirci di apprezzare meglio le variazioni dell'espressione.

Il silenziamento degli mRNA codificanti le proteine EBP1 e DRBP76/NF90, è stato effettuato utilizzando "*small interfering RNA*" (siRNA) specifici per EBP1 (siEBP1) e NF90 (siNF90) (Tabella 1). Oltre ai campioni transfettati con i siRNA specifici, in ogni esperimento, è stato preparato anche un campione, transfettato con un siRNA di controllo (siCtrl), che non è bersaglio per alcun gene.

3.2.1 Analisi della riduzione di EBP1 e NF90 per *Western blot* e citofluorimetria

L'avvenuto silenziamento degli mRNA è stato valutato, oltre che in esperimenti di *Real time* quantitativa (qRT-PCR), anche osservando la diminuzione delle proteine EBP1 e NF90 per *Western blot*. Le proteine totali, raccolte dopo 48 ore dalla transfezione, sono state lisate con tampone RIPA, separate mediante SDS-

PAGE e trasferite su membrana di PVDF. L'immunorilevazione è stata eseguita usando gli anticorpi anti-EBP1, anti-DRBP76 e anti-Tubulina (Figura 12).

Di seguito al silenziamento, è stato anche valutato il livello di espressione dell'eterodimero (HLA-DR) sulla superficie cellulare. L'analisi di citometria a flusso è stata effettuata mediante immunofluorescenza diretta, utilizzando anticorpi anti-HLA-DR-FITC, dopo 72 ore dalla transfezione dei siRNA. Per entrambi i campioni transfettati con siEBP1 e siNF90 è stata dimostrata una diminuzione in superficie degli eterodimeri, rispettivamente del 60% e 45%, rispetto al campione di controllo (Figura 13).

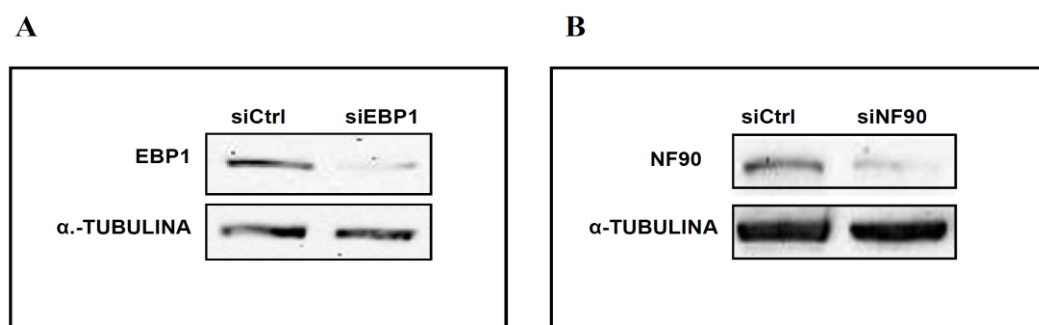


Figura 12. Analisi delle proteine EBP1 e NF90 dopo silenziamento genico. Le proteine, estratte dalle cellule M14 dopo 48 ore di transfezione con siRNA specifici (siEBP1, siNF90) e siRNA controllo (siCtrl), sono state frazionate per SDS-PAGE e trasferite su un filtro PVDF per l'immunorivelazione con gli anticorpi anti-EBP1 (pannello A) e anti-NF90 (pannello B). Sugli stessi filtri è stato eseguito anche un Western blot con l'anticorpo anti-Tubulina come controllo del quantitativo proteico caricato.

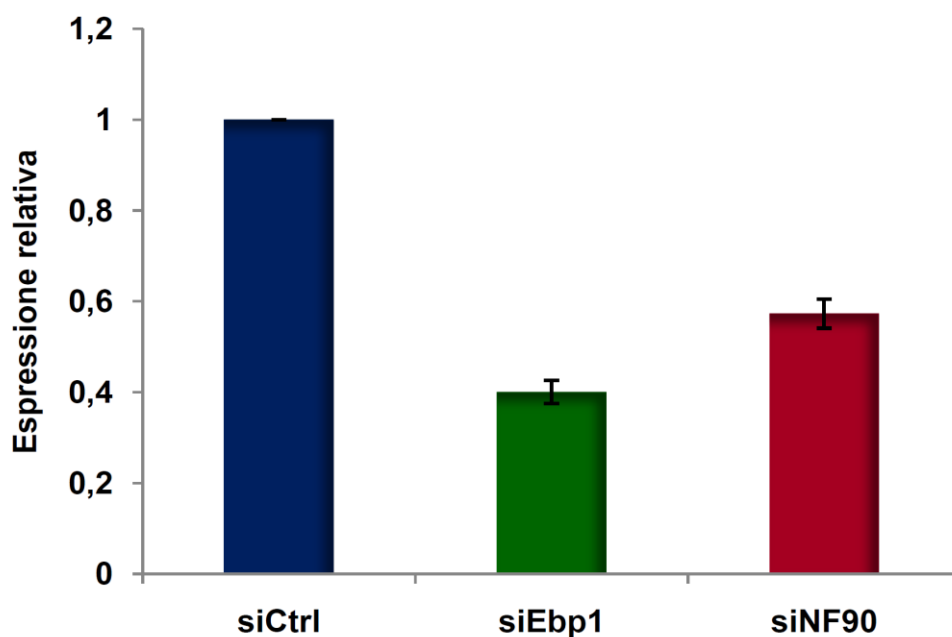


Figura 13. Espressione in superficie dell'eterodimero HLA-DR dopo silenziamento genico. L'analisi di citometria a flusso è stata effettuata mediante immunofluorescenza diretta, utilizzando anticorpi anti-HLA-DR-FITC, dopo 72 ore dalla transfezione dei siRNA specifici (siEBP1 e siNF90) e del siRNA controllo (siCtrl). In grafico è riportata l'espressione relativa dell'eterodimero HLA-DR. Il valore di espressione delle cellule trattate con siCtrl è stato assunto uguale a 1.

3.2.2 Effetto della riduzione di EBP1 e NF90 sugli mRNA MHCII

Al fine di spiegare la variazione di esposizione in superficie dell'eterodimero HLA-DR, è stato valutato l'accumulo degli mRNA per MHCII in esperimenti di *Real time-PCR* quantitativa (qRT-PCR). L'esperimento è stato allestito in modo da prelevare l'RNA totale dalle cellule M14 a 48 ore dalla transfezione dei siRNA siEBP1 e siNF90. Nei campioni in cui è stata ridotta l'espressione di EBP1 abbiamo osservato una riduzione del 67% dell'mRNA per HLA-DRA, del 49 % dell'mRNA per HLA-DRB1 e del 45% dell'mRNA per HLA-DQA1, rispetto ai relativi campioni controllo (Figura 14, pannello A). Nell'esperimento in cui è stata diminuita l'espressione di NF90, abbiamo osservato una riduzione degli mRNA per MHCII del 57%, 52 % e 40 %, rispettivamente per l'mRNA di HLA-DRA, HLA-DRB1 e HLA-DQA1 (Figura 14, pannello B). Per valutare se questa modulazione, a seguito della deplezione di EBP1 e NF90, era specifica per gli mRNA di MHCII, abbiamo esaminato anche l'espressione di un gruppo di mRNA correlati al nostro sistema, i trascritti per MHC di classe I (HLA-A-B-C), e di un trascritto ad essi non correlato, cioè per TBX1 [62]. In entrambi i casi non è stata osservata alcuna variazione.

Questi risultati indicano che la mancanza delle proteine EBP1 e NF90 generano specificamente una diminuzione del livello dei trascritti per MHCII.

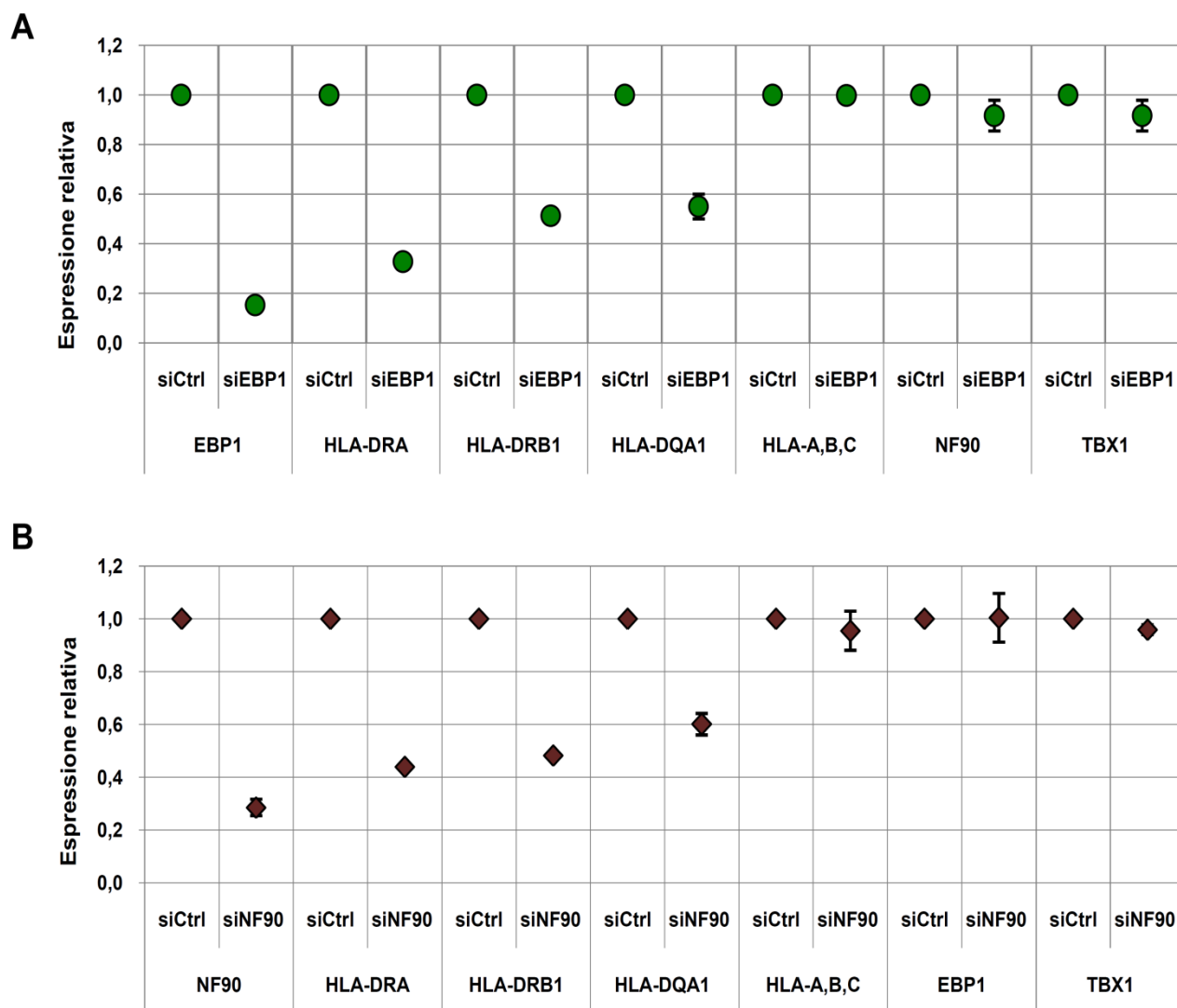


Figura 14. Modulazione dell'espressione degli mRNA dopo silenziamento genico di EBP1 (pannello A) e NF90 (pannello B)). L'analisi degli mRNA (indicati sull'asse delle ascisse) è stata effettuata mediante esperimenti di qRT-PCR su campioni di RNA totale, ottenuti da cellule M14, transfettate con siRNA specifici e siCtrl. In grafico è riportata l'espressione relativa dei vari messenger; il valore di espressione delle cellule trattate con siCtrl è stato assunto uguale a 1.

3.2.3 Effetto della riduzione di EBP1 e NF90 sulla stabilità degli mRNA MHCII

Per verificare se le proteine EBP1 e NF90 siano coinvolte in fenomeni di regolazione post-trascrizionale degli mRNA per MHCII, come ad esempio nella stabilità, abbiamo misurato l'emivita dei messaggeri HLA-DRA e HLA-DRB1 dopo il silenziamento. In particolare, dopo 48 ore dalla transfezione dei siRNA, abbiamo trattato le cellule silenziate con Actinomicina D (10 µg/ml), una sostanza che blocca la trascrizione, e abbiamo misurato l'emivita dei trascritti determinandone la quantità a tempi diversi (0, 2 e 4 h) dall'aggiunta dell'Actinomicina D, mediante qRT-PCR. Abbiamo osservato un significativo incremento dell'emivita dei trascritti HLA-DRA e HLA-DRB1 nei campioni transfettati con siEBP1 e siNF90 (Figura 15, pannello A e B), che, da un valore di $t_{1/2} = 2,5-4$ ore in cellule non trattate con siRNA o transfettate con siCtrl, diventa $t_{1/2} > 8$ ore in cellule transfettate con siEBP1 e siNF90.

Questi risultati indicano che il legame sia della proteina EBP1 che della proteina NF90 alla regione 3'UTR dei trascritti per MHCII regola la stabilità di questi trascritti, mentre la deplezione delle proteine ne incrementa l'emivita.

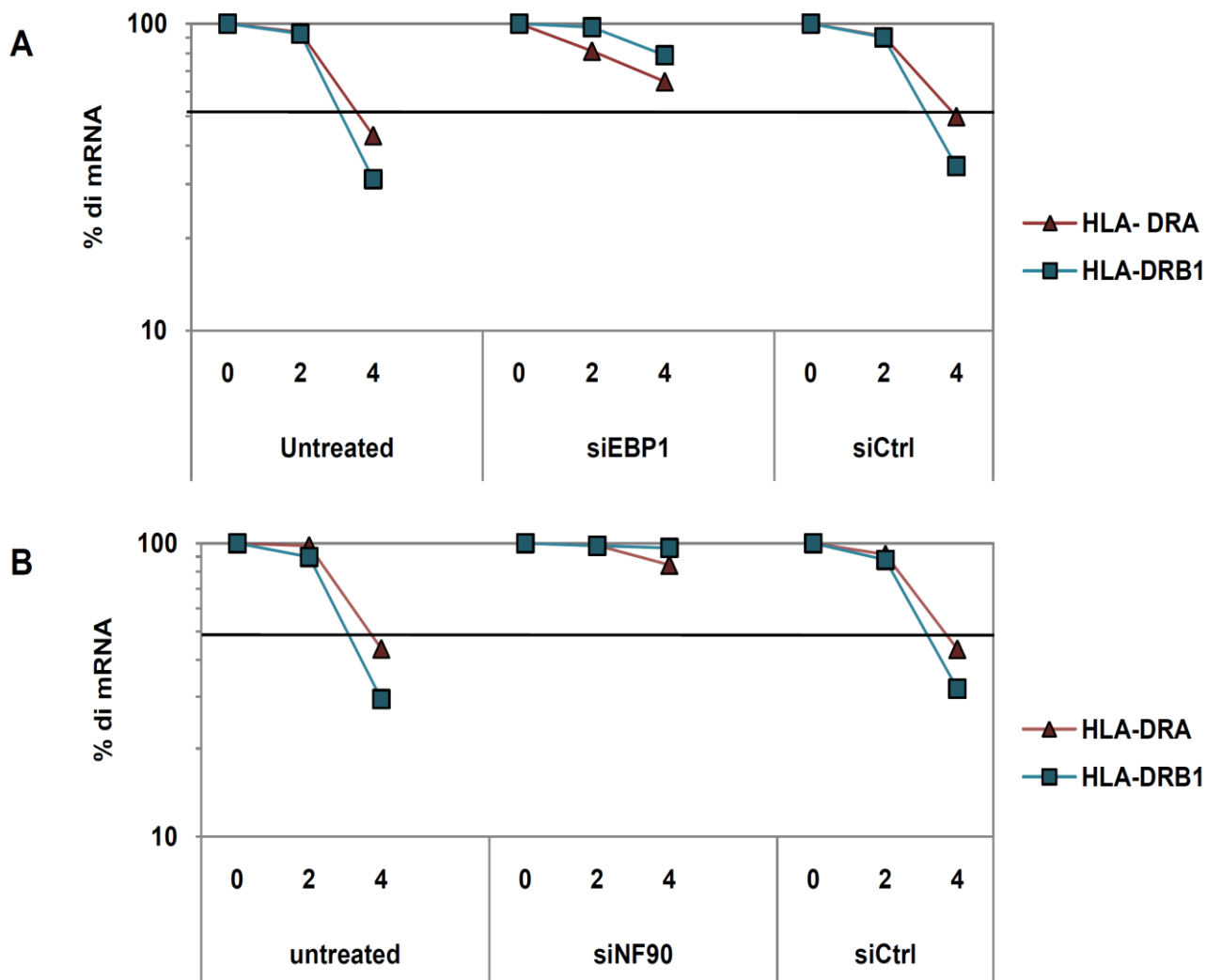


Figura 15. Analisi dell'emivita degli mRNA HLA-DRA e HLA-DRB1 dopo silenziamento di EBP1 (pannello A) e NF90 (pannello B). La diminuzione dell'mRNA espressa in percentuale è stata misurata (mediante qRT-PCR) a 0, 2, e 4 h dal trattamento con Actinomycin D.

3.3 Analisi della coregolazione degli mRNA per HLA-DRA e HLA-DRB1

Abbiamo dimostrato che le proteine EBP1 e NF90 si legano alla regione 3'UTR di diversi mRNA per MHCII, codificanti per le catene alfa e beta. Quindi, abbiamo ipotizzato l'esistenza di un complesso che, interagendo contemporaneamente con i diversi trascritti, ne determini anche un'associazione fisica nel citoplasma.

A tale scopo abbiamo effettuato alcuni esperimenti in cui abbiamo modulato, mediante sovrespressione e silenziamento genico, la quantità dell'mRNA codificante un singolo polipeptide e analizzato l'accumulo dell'altro. In particolare abbiamo valutato se la quantità dell'mRNA per HLA-DRA (codificante la catena alfa) potrebbe influenzare la quantità dell'mRNA per HLA-DRB1 (codificante la catena beta) e viceversa. Gli esperimenti descritti in seguito dimostrano che esiste un bilancio nell'accumulo dei due messaggeri.

3.3.1 Transfezione dei cDNA di HLA-DRA e HLA-DRB1

La linea cellulare di melanoma, M14, è stata transfettata transientemente con i plasmidi pDRA e pDRB1, contenenti rispettivamente il cDNA completo degli mRNA di HLA-DRA e HLA-DRB1 (comprese le regioni 5'UTR e 3'UTR), con i plasmidi pDRA Δ e pDRB1 Δ , contenenti rispettivamente, il cDNA completo dei messaggeri per HLA-DRA e HLA-DRB1 (comprese le regioni 5'UTR, ma senza le regioni 3'UTR) e, infine, con il plasmide pSVK3, cioè il vettore "vuoto" usato per clonare i suddetti cDNA. L'analisi citofluorimetrica, dopo 48 di transfezione, ha mostrato un aumento dell'espressione dell'eterodimero HLA-DR in seguito alla transfezione di pDRA o pDRB1. Diversamente, quando sono stati transfettati i plasmidi pDRA Δ e pDRB1 Δ , o il plasmide "vuoto" pSVK3, non è stato osservato alcun incremento dell'eterodimero in superficie (Figura 16). Questo risultato indica un ruolo fondamentale svolto dalla regione 3'UTR nella modulazione della densità di superficie delle molecole MHCII.

Mediante analisi qRT-PCR (Figura 17) abbiamo dimostrato che l'incremento dell'eterodimero corrisponde ad un aumento della quantità degli mRNA. Infatti quando è stato transfettato il plasmide pDRA abbiamo osservato un aumento del messaggero per HLA-DRA (risultante dalla somma del trascritto genomico e del trascritto plasmidico), come atteso, ma anche di quello endogeno per HLA-DRB1 e viceversa. Non sono state viste variazioni significative dopo transfezione dei plasmidi pDRA Δ , pDRB1 Δ e pSVK3. Questo risultato dimostra che l'espressione ectopica di un messaggero codificante una catena influenza l'accumulo del messaggero endogeno codificante l'altra catena e che tale regolazione dipende dalla regione 3'UTR.

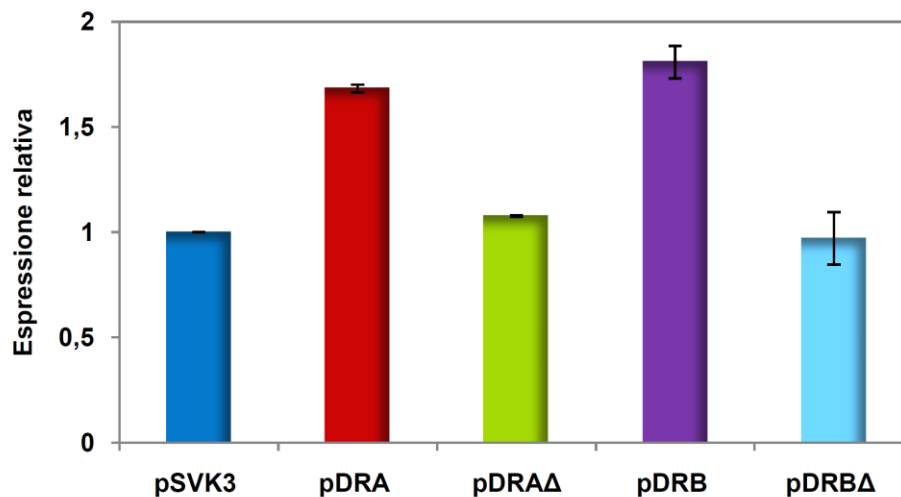


Figura 16. Espressione in superficie dell'eterodimero HLA-DR dopo transfezione. L'analisi di citometria a flusso è stata effettuata mediante immunofluorescenza diretta, utilizzando anticorpi anti-HLA-DR-FITC, dopo 48 ore dalla transfezione dei plasmidi indicati sull'asse delle ascisse. Il valore di espressione delle cellule trattate con siCtrl viene imposto uguale a 1.

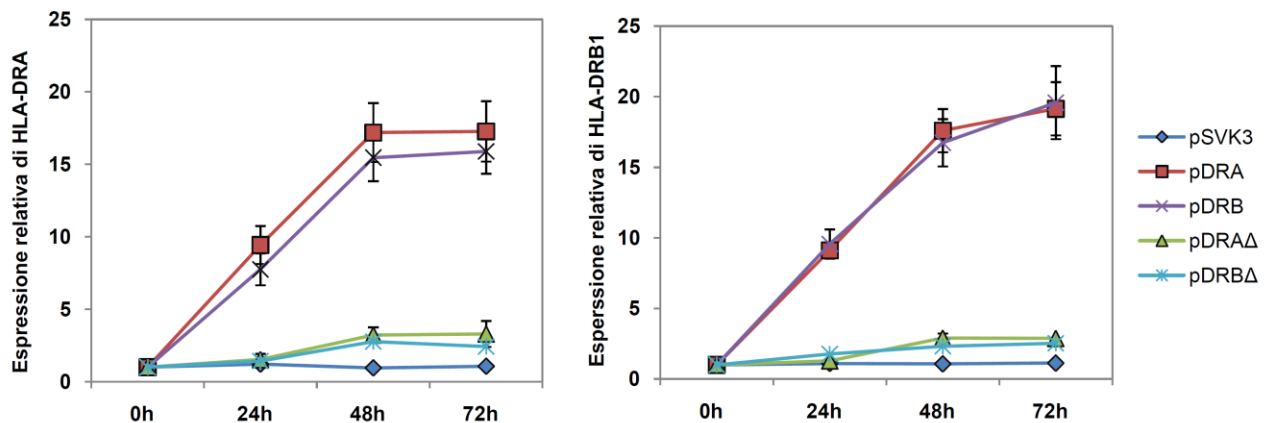


Figura 17. Espressione dei trascritti per HLA-DRA (pannello A) e per HLA-DRB1 (pannello B), dopo transfezione con plasmidi. A destra fuori la figura sono indicati i plasmidi utilizzati per le trasfezioni di cellule M14. L'analisi è stata effettuata mediante esperimenti di qRT-PCR su campioni di RNA totale. Il valore di espressione delle cellule trattate con siCtrl viene imposto uguale a 1.

3.3.2 Silenziamento degli mRNA HLA-DRA e HLA-DRB1

Abbiamo effettuato esperimenti di silenziamento (in cellule M14) usando siRNA bersaglio per gli mRNA di HLA-DRA e HLA-DRB1 (siDRA e siDRB1), in modo da ridurre individualmente i livelli citoplasmatici di uno solo dei due messaggeri ed esaminarne l'effetto sull'accumulo dell'altro. Dopo 72 ore dalla transfezione dei siRNA, è stata valutata l'espressione dell'eterodimero HLA-DR sulla superficie cellulare ed è stata osservata una diminuzione di esso, del 50% e 48%, nei campioni transfettati rispettivamente con siDRA e siDRB1 (Figura 18).

Abbiamo poi valutato, in esperimenti di qRT-PCR, la variazione del livello dei messaggeri per HLA-DRA e HLA-DRB1 a 24, 48 e 72 h dalla transfezione. Nei campioni transfettati con siDRA, dopo la diminuzione dell'mRNA bersaglio (cioè quello per HLA-DRA), abbiamo osservato anche una significativa diminuzione (86%) del messaggero per HLA-DRB1. Similmente è avvenuto per i campioni transfettati con siDRB1. Anche in questo caso, infatti, dopo una riduzione dell'mRNA per HLA-DRB1, abbiamo evidenziato una riduzione (81%) del trascritto per HLA-DRA (Figura 19). Questi risultati indicano che il silenziamento specifico di un messaggero codificante per una catena dell'eterodimero, induce una diminuzione del messaggero dell'altra catena già dopo 24 ore. Questo dato suggerisce che la variazione dell'accumulo di uno dei due mRNA è relazionata a quella dell'altro; ciò fa supporre che i due mRNA potrebbero essere associati fisicamente in un unico complesso RNP e la loro espressione, potrebbe essere coregolata durante il *processing* dalle RBP identificate.

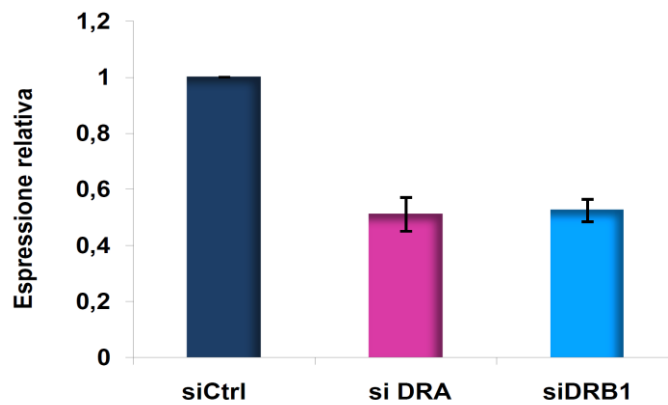


Figura 18. Esposizione dell'eterodimero HLA-DR, dopo silenziamento con siDRA e siDRB1. L'analisi di citometria a flusso è stata effettuata mediante immunofluorescenza diretta, utilizzando anticorpi anti-HLA-DR-FITC, dopo 72 ore dalla transfezione con siRNA. I risultati sono riportati come variazione dell'espressione relativa dell'eterodimero HLA-DR sulla superficie cellulare. Il valore di espressione delle cellule trattate con siCtrl viene imposto uguale a 1.

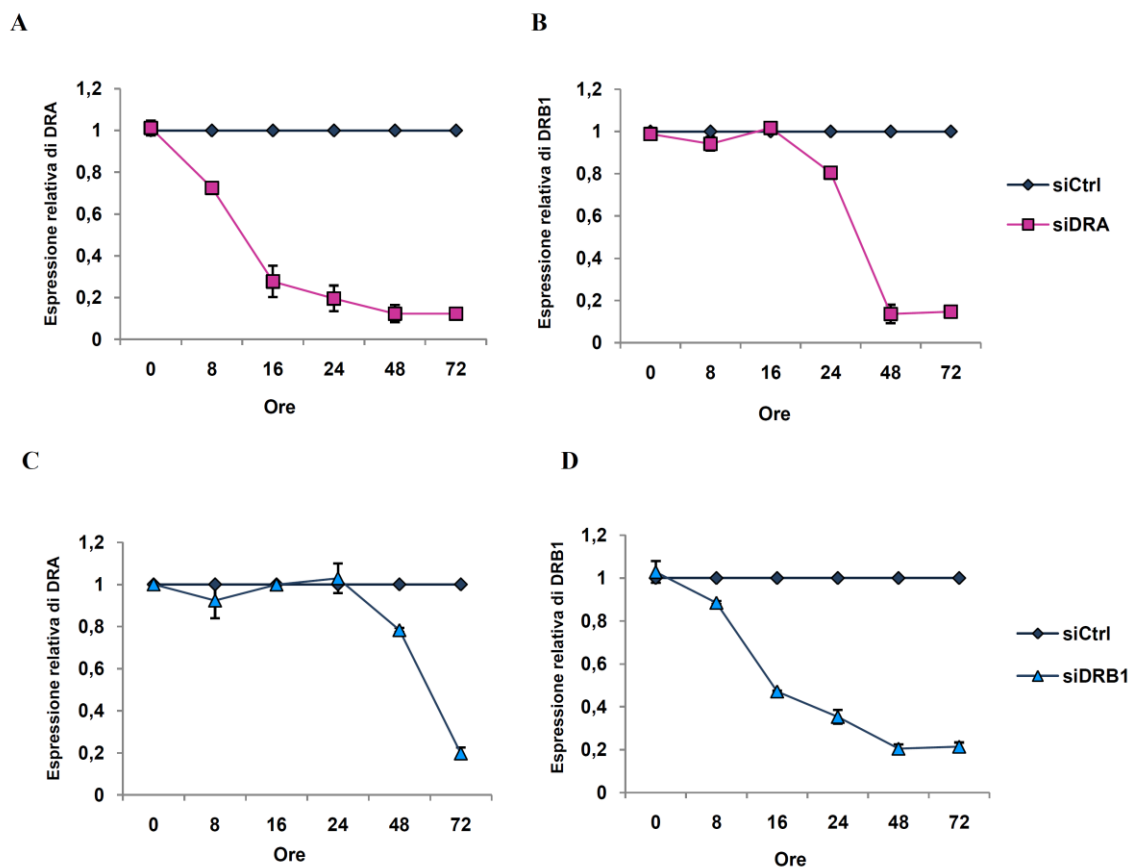


Figura 19. Espressione di HLA-DRA e HLA-DRB1 dopo silenziamento dei messaggeri per HLA-DRA (pannello A e B) e HLA-DRB1 (pannello C e D). L'analisi degli mRNA (indicati per ogni grafico sull'asse delle ordinate), è stata effettuata mediante esperimenti di qRT-PCR con campioni di RNA totale, ottenuti da cellule M14 silenziate con siRNA specifici e siCtrl. In grafico è riportata l'espressione relativa dei trascritti indicati. Il valore di espressione delle cellule trattate con siCtrl viene imposto uguale a 1.

4 DISCUSSIONE

Le molecole MHC di classe II sono fondamentali nell'induzione e nella regolazione della risposta immune adattativa al patogeno e nel mantenimento della tolleranza al self perché guidano l'attivazione e l'espansione delle cellule T helper. Molti studi sono stati effettuati sulla regolazione trascrizionale dei geni MHC di classe II, portando all'identificazione degli elementi regolatori agenti in *cis* e in *trans* coinvolti in tale processo. Tuttavia, relativamente poco si conosce sull'esistenza di possibili eventi post-trascrizionali che potrebbero avere un ruolo nella modulazione della densità delle molecole MHC di classe II sulla superficie cellulare. Il numero di molecole espresse in superficie è sicuramente un fattore limitante l'intensità della risposta immunitaria nei confronti di un antigene; infatti, l'attivazione delle cellule T è dipendente anche dalla quantità di complessi MHC-peptide esposti dalle cellule presentanti l'antigene.

La maggior parte degli eventi di regolazione post-trascrizionale a carico degli RNA messaggeri sono governati dall'associazione dinamica di essi con le RNA *binding proteins* (RBP). Le regioni presenti alle estremità 5' e 3' UTR degli mRNA rappresentano importanti elementi di regolazione [63], in particolare si attribuisce all'estremità 3' un più ampio ruolo regolativo come, ad esempio, il trasporto, la localizzazione, la stabilità e la traduzione, attraverso appunto l'interazione di RBP con diversi elementi regolatori, quali sequenze consensus o strutture secondarie, che agiscono in *cis* all'interno della regione 3'UTR [24]. Dati recenti hanno dimostrato che multipli RNA sono regolati da una o più RBP in complessi ribonucleoproteici RNP. È il caso di trascritti funzionalmente correlati, che sono tenuti insieme nel tempo e nello spazio nei cosiddetti "operoni a RNA", e regolati in

modo da garantire l'espressione coordinata di un insieme di proteine che intervengono nella stessa via metabolica [49].

In questo lavoro di dottorato sono state identificate due proteine interagenti con la 3'UTR dei messaggeri MHCII: EBP1 e DRBP76/NF90. Studi sulla regolazione post-trascrizionale degli mRNA codificanti gli antigeni MHC di classe II (in cellule B umane), riguardanti la stabilità hanno dimostrato che la modulazione dell'espressione di questi trascritti è a carico di fattori citoplasmatici [50, 51] e che l'esporto di tali messaggeri dal nucleo al citoplasma è regolata da proteine interagenti con la 3'UTR [52]. Nel corso di questo lavoro sperimentale abbiamo utilizzato tre sonde polinucleotidiche sintetizzate *in vitro*: 3-DRA, 3-DRB1 e 3-DQA1, corrispondenti alle regioni 3'UTR dei trascritti MHCII e effettuato due tipi di saggi di legame all'RNA. Nei saggi *Northwestern* come in quelli REMSA le sonde 3-DRA e 3-DQA1 hanno mostrato uno stesso profilo di interazione con le proteine, ed è stato anche trovato che esse competono per il legame alle stesse proteine. Diversamente la sonda 3-DRB1 ha mostrato interazione con estratti citoplasmatici soltanto in esperimenti *Northwestern*, quindi in condizioni denaturanti. Queste regioni 3'UTR legano proteine preparate sia da linfociti B che ottenute da una linea di melanoma (M14), positiva per l'espressione delle molecole MHCII, indicando che questa interazione non è tessuto-specifica.

Per identificare le proteine incluse nel complesso di legame abbiamo purificato l'estratto citoplasmatico S100, ottenuto dalla linea Raji (APC professionale), dapprima mediante una cromatografia di affinità e in seguito con una a scambio anionico. Saggi *Northwestern* sulle frazioni cromatografiche ci hanno permesso di individuare le bande che interagiscono con le sonde e mediante

analisi di spettrometria di massa abbiamo identificato due proteine con massa molecolare apparente di 50 e 90 KDa, rispettivamente EBP1 e DRBP76/NF90.

EBP1 è l'omologo umano della proteina di topo p38-2G4 [64], inizialmente è stata identificata come una proteina legante il recettore Erb3 da cui ha preso il nome. Esistono due isoforme proteiche di 42 e 48 kDa e dati di letteratura hanno suggerito che la forma più breve di EBP1, p42 agisce come un potente soppressore tumorale, inibendo la proliferazione cellulare e promuovendo il differenziamento, mentre la forma più lunga, p48, potrebbe funzionare come un oncogene, promuovendo la sopravvivenza cellulare e la proliferazione e bloccando il differenziamento [65, 66]. È stato dimostrato che i topi deficienti di EBP1 sono in media più piccoli del 30% rispetto ai selvatici, indicando che questa proteina può influenzare la crescita nel modello animale [67]. Inizialmente, la proteina EBP1 è stata identificata come un IRES *trans acting* factor (per questo definito anche ITAF45) cioè in grado di legare particolari regioni strutturate di RNA nella 5'UTR di messaggeri virali o cellulari controllandone la traduzione Cap-indipendente [68]. La sua struttura cristallografica [69] ha confermato che EBP1 contiene un dominio dsRBD (*double stranded RNA Binding Protein*), che gli consente di legare diversi motivi strutturati nelle molecole di RNA.

Dati di letteratura sembrano indicare un duplice ruolo per EBP1 come regolatore sia a livello trascrizionale che post-trascrizionale. E' stato dimostrato che EBP1 inibisce la trascrizione del gene codificante il recettore dell'androgeno (AR), e del fattore di trascrizione E2F1, agendo sui rispettivi promotori [70] e interagendo con le istone deacetilasi (HDAC). Tuttavia, Zhou ed altri [71] hanno recentemente dimostrato che EBP1 è anche capace di regolare i trascritti AR a livello post-trascrizionale, promuovendone la degradazione attraverso

l'interazione con motivi *UC-rich* conservati nella 3'UTR. Inoltre è stato indicato che EBP1 è capace di regolare la stabilità dell'mRNA di Bcl2, attraverso il legame alle sequenze *AU-rich* nella 3'UTR di questo trascritto [72]. Infine, EBP1 può anche essere considerato un fattore di crescita nucleolare; infatti regola la biosintesi dei ribosomi e la proliferazione cellulare. Nel citoplasma, EBP1 è stata trovata, in associazione con i ribosomi 80S e polisomi, a regolare i processi di traduzione [55, 71, 73, 74].

DRBP76/NF90 [75], è un membro della famiglia delle *dsRNA binding proteins* (DRBP) in grado di legare sia RNA superavvolti a doppio filamento sia RNA a singolo filamento [76] attraverso due domini DRBD (*Double RNA Binding domain*) presenti al C-terminale. Il gene che codifica per la proteina NF90, conosciuto come ILF3 o anche NFAR (*nuclear factors associated with dsRNA*) si trova sul cromosoma 19 [77] e per *splicing* alternativo genera almeno cinque specie distinte di RNA messaggeri. Non tutti questi trascritti codificano per le proteine, infatti ne esistono solo due isoforme una di 90 kDa, DRBP76 [75], definita anche NF90 e NFAR-1 [78], e una di 110 kDa, definita NF110 [79], NFAR2 [78], TCP110 [80] e ILF3 [81]. Le due isoforme differiscono per *splicing* alternativo nella regione al C-terminale. È indicato che topi privi della proteina NF90 muoiono entro 12 ore dalla nascita [82] per un'insufficienza respiratoria correlata alla riduzione dell'espressione di MyoD, miogenina e p21Cip1/Waf1 [83]. In aggiunta questi topi mostrano un'espressione alterata di interleuchina 2 (IL-2). In cellule T attivate, infatti, NF90 è stato trovato regolare l'attivazione genica di IL-2 perché, insieme con altre proteine, è in grado di legare nel promotore di IL-2, un motivo ricco in purine, l'*antigen receptor response element* (ARRE) [84]. NF90 lega anche il sito HS4 nel promotore dell'interleuchina 13 (IL-13) incrementandone l'espressione

genica durante l'attivazione dei linfociti T [85], e il sito DHS-II (*DNasi I hypersensitive sites*) nel primo introne del gene HLA-DRA, nelle cellule THP1 e HeLa [86]. In quest'ultimo caso l'interazione e la conseguente modulazione della trascrizione, da parte di NF90, sembra essere strettamente correlata al tipo cellulare e al loro stato di attivazione. Studi più recenti hanno supportato un ruolo di DRBP76/NF90 principalmente come RBP, infatti, attraverso il legame con la 3'UTR di diversi messaggeri può influenzare il trasporto nucleo-citoplasma e modulare la stabilità e la traduzione. È stato trovato che NF90 interagisce con le sequenze *AU-rich* (ARE) della 3'UTR del IL-2 rallentandone la degradazione in cellule T attivate [82], stabilizza insieme alla proteina HuR l'RNA messaggero di MKP-1 (*Mitogen-activated protein MAP kinase Phosphatase 1*) durante lo stress ossidativo [87], e regola la stabilità e la traduzione di VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) legandosi ad un motivo *stem-loop* (definito HSR) nella sua 3'UTR [88]. Infine, Pfeifer e colleghi [89] hanno dimostrato che NF90 influenza il trasporto dei messaggeri dal nucleo al citoplasma; la proteina è stata infatti trovata associata a complessi ribonucleoproteici che regolano l'*export*. Il *knockout* di NF90 causa un incremento della sintesi proteica, e nei fibroblasti di topo, una maggiore suscettibilità al virus della stomatite vescicolare. Altri autori [90] hanno trovato che NF90 regola negativamente la replicazione del virus dell'influenza mediante interazione con la nucleoproteina virale H5N1. Quindi per NF90 si ipotizza anche un coinvolgimento nell'immunità innata e in meccanismi di sorveglianza traduzionale nella difesa alle infezioni virali.

Considerando quindi i lavori disponibili in letteratura, al fine indagare sul ruolo funzionale di queste proteine nei confronti dei trascritti MHCII, abbiamo silenziato gli mRNA codificanti EBP1 e NF90, e abbiamo valutato l'accumulo e la

stabilità dei trascritti MHCII. I nostri dati hanno mostrato che **la riduzione delle proteine EBP1 e NF90 determina una diminuzione degli mRNA per MHC di classe II (HLA-DRA, DQA1 e DRB1)**. Tale diminuzione può essere spiegata da una funzione a livello trascrizionale da parte di entrambe le proteine. Molti lavori pubblicati indicano che la funzione del transattivatore dei geni MHC di classe II, CIITA, è inibita dalle istone deacetilasi (HDAC) e questa azione richiede un corepressore delle HDAC, Sin3A [91, 92]. Dal momento che EBP1 inibisce la trascrizione di AR interagendo con HDAC e Sin3A [70, 93], speculiamo che la sua deplezione sopprima anche la trascrizione dei geni MHCII, nel sistema cellulare utilizzato. EBP1 quindi funzionerebbe come un inibitore delle HDAC, le quali staccandosi dal promotore, consentirebbero l'interazione del transattivatore CIITA e la trascrizione dei geni MHCII. EBP1, quindi, permetterebbe, quando espresso, la trascrizione dei geni MHCII nelle cellule tumorali favorendone la conversione ad APC non professionali capaci di intervenire nella risposta immunitaria al tumore [94].

Per quanto concerne NF90 è già stato dimostrato che esso è capace di legare i promotori di diversi geni [84, 85] coinvolti nella risposta immunitaria e interagisce con il primo introne del gene HLA-DRA [86]. Di conseguenza il suo ruolo come attivatore trascrizionale è stato ampiamente definito e noi proponiamo che, nel caso della trascrizione dei geni MHCII, la sua deplezione ne riduce drasticamente l'espressione.

Tuttavia EBP1 e DRBP76/NF90 potrebbero legare i trascritti MHCII subito dopo la trascrizione e funzionare anche a livello post-trascrizionale, regolandone l'esporto dal nucleo e il *processing* nel citoplasma. Infatti nel lavoro di Del Pozzo [52], il legame della 3'UTR a proteine citoplasmatiche era stato associato al

trasporto regolato dal nucleo al citoplasma ed in letteratura è stato dimostrato che NF90 modula in generale la redistribuzione dei messaggeri e quindi il trasporto.

In seguito al silenziamento genico di EBP1 e NF90 abbiamo valutato anche l'emivita dei trascritti MHCII. **La riduzione delle proteine EBP1 ed NF90 genera un incremento della emivita dei messaggeri MHCII.** Tale risultato indica che le due proteine agirebbero anche a livello post-trascrizionale destabilizzando i messaggeri MHCII. Questo dato trova riscontro nei lavori di letteratura già citati che dimostrano per EBP1 un ruolo importante nella destabilizzazione del trascritto AR, in seguito all'interazione con la 3'UTR, mentre per NF90 è descritta una funzione stabilizzante. Dati i risultati possiamo speculare anche per NF90 un ruolo nel *processing* dei trascritti MHCII, in una maniera peculiare rispetto a quanto descritto in letteratura.

I risultati ottenuti da esperimenti di transfezione e silenziamento dei messaggeri codificanti le catene alfa e beta dell'eterodimero HLA-DR mostrano che **l'iperespressione di uno dei due messaggeri genera un aumento anche dell'altro, mentre la riduzione di uno dei due messaggeri causa diminuzione dell'altro.** Sembra quindi che tali trascritti siano fisicamente associati e coregolati durante il *processing* nel citoplasma grazie al legame con le stesse proteine. Noi proponiamo che EBP1 e NF90 facciano parte di uno stesso complesso RNP, probabilmente in associazione con altri fattori, sarebbero in grado di consentire un'espressione bilanciata dei messaggeri codificanti le due catene alfa e beta. Tali proteine, già note per legare regioni dsRNA, e considerando la presenza nella 3'UTR dei trascritti MHCII di zone AU-rich e CU-rich, potrebbero interagire con una struttura secondaria e/o fattori con attività in *cis* condivisi dalla 3'UTR degli mRNA MHCII. Questa ipotesi suggerirebbe che questi mRNA codificanti molecole diverse

ma con la stessa funzione di presentazione dell'antigene, potrebbero far parte di un medesimo "operone a RNA" come unità funzionale nella risposta immunitaria adattativa al patogeno.

L'accoppiamento di eventi di regolazione trascrizionali e post-trascrizionali, rappresenta un'ipotesi ancora non validata, ma interessante soprattutto alla luce del modello dell'operone MHCII, in cui, tutti questi trascritti coinvolti nella presentazione dell'antigene sarebbero inclusi in un medesimo operone, all'interno del quale, EBP1 e NF90 modulerebbero l'espressione in relazione a differenti *pathways* fisiologici.

5 BIBLIOGRAFIA

1. Cresswell, P., *Assembly, transport, and function of MHC class II molecules*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 259-93.
2. Brown, J.H., et al., *Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1*. Nature, 1993. **364**(6432): p. 33-9.
3. LeibundGut-Landmann, S., et al., *Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes*. Eur J Immunol, 2004. **34**(6): p. 1513-25.
4. Reith, W. and B. Mach, *The bare lymphocyte syndrome and the regulation of MHC expression*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 331-73.
5. Waldburger, J.M., et al., *Lessons from the bare lymphocyte syndrome: molecular mechanisms regulating MHC class II expression*. Immunol Rev, 2000. **178**: p. 148-65.
6. Krawczyk, M. and W. Reith, *Regulation of MHC class II expression, a unique regulatory system identified by the study of a primary immunodeficiency disease*. Tissue Antigens, 2006. **67**(3): p. 183-97.
7. Glimcher, L.H. and C.J. Kara, *Sequences and factors: a guide to MHC class-II transcription*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 13-49.
8. Muhlethaler-Mottet, A., et al., *Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA*. EMBO J, 1997. **16**(10): p. 2851-60.
9. Reith, W., S. LeibundGut-Landmann, and J.M. Waldburger, *Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(10): p. 793-806.
10. Masternak, K., et al., *CIITA is a transcriptional coactivator that is recruited to MHC class II promoters by multiple synergistic interactions with an enhanceosome complex*. Genes Dev, 2000. **14**(9): p. 1156-66.
11. DeSandro, A.M., U.M. Nagarajan, and J.M. Boss, *Associations and interactions between bare lymphocyte syndrome factors*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(17): p. 6587-99.
12. Fontes, J.D., et al., *Interactions between the class II transactivator and CREB binding protein increase transcription of major histocompatibility complex class II genes*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 941-7.
13. Kanazawa, S., T. Okamoto, and B.M. Peterlin, *Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection*. Immunity, 2000. **12**(1): p. 61-70.
14. Guardiola, J. and A. Maffei, *Control of MHC class II gene expression in autoimmune, infectious, and neoplastic diseases*. Crit Rev Immunol, 1993. **13**(3-4): p. 247-68.

15. Knutson, K.L. and M.L. Disis, *Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, 2005. **54**(8): p. 721-8.
16. Holling, T.M., et al., *Regulation of MHC class II expression in human T-cell malignancies*. Blood, 2004. **103**(4): p. 1438-44.
17. Rimsza, L.M., et al., *Loss of MHC class II gene and protein expression in diffuse large B-cell lymphoma is related to decreased tumor immunosurveillance and poor patient survival regardless of other prognostic factors: a follow-up study from the Leukemia and Lymphoma Molecular Profiling Project*. Blood, 2004. **103**(11): p. 4251-8.
18. Altomonte, M., et al., *Targeted therapy of solid malignancies via HLA class II antigens: a new biotherapeutic approach?* Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6564-9.
19. Matsushita, K., et al., *HLA-DR antigen expression in colorectal carcinomas: influence of expression by IFN-gamma in situ and its association with tumour progression*. Br J Cancer, 1996. **73**(5): p. 644-8.
20. Andersen, S.N., et al., *Strong HLA-DR expression in large bowel carcinomas is associated with good prognosis*. Br J Cancer, 1993. **68**(1): p. 80-5.
21. Wright, K.L. and J.P. Ting, *Epigenetic regulation of MHC-II and CIITA genes*. Trends Immunol, 2006. **27**(9): p. 405-12.
22. Radosevich, M., et al., *Epigenetic silencing of the CIITA gene and posttranscriptional regulation of class II MHC genes in ocular melanoma cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(9): p. 3185-95.
23. Meissner, M., et al., *Loss of interferon-gamma inducibility of the MHC class II antigen processing pathway in head and neck cancer: evidence for post-transcriptional as well as epigenetic regulation*. Br J Dermatol, 2008. **158**(5): p. 930-40.
24. Conne, B., A. Stutz, and J.D. Vassalli, *The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology?* Nat Med, 2000. **6**(6): p. 637-41.
25. Mukherjee, N., et al., *Coordinated posttranscriptional mRNA population dynamics during T-cell activation*. Mol Syst Biol, 2009. **5**: p. 288.
26. Wilusz, C.J., M. Wormington, and S.W. Peltz, *The cap-to-tail guide to mRNA turnover*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(4): p. 237-46.
27. Preiss, T. and W.H. M., *Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation*. Bioessays, 2003. **25**(12): p. 1201-11.
28. Sachs, A.B., *Messenger RNA degradation in eukaryotes*. Cell, 1993. **74**(3): p. 413-21.
29. Barreau, C., L. Paillard, and H.B. Osborne, *AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?* Nucleic Acids Res, 2005. **33**(22): p. 7138-50.
30. Khabar, K.S., *The AU-rich transcriptome: more than interferons and cytokines, and its role in disease*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(1): p. 1-10.

31. Balmer, L.A., et al., *Identification of a novel AU-Rich element in the 3' untranslated region of epidermal growth factor receptor mRNA that is the target for regulated RNA-binding proteins*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 2070-84.
32. Dean, J.L., et al., *The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(3): p. 721-30.
33. Jing, Q., et al., *Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability*. Cell, 2005. **120**(5): p. 623-34.
34. Fan, X.C. and J.A. Steitz, *Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs*. EMBO J, 1998. **17**(12): p. 3448-60.
35. Sully, G., et al., *Structural and functional dissection of a conserved destabilizing element of cyclo-oxygenase-2 mRNA: evidence against the involvement of AUF-1 [AU-rich element/poly(U)-binding/degradation factor-1], AUF-2, tristetraprolin, HuR (Hu antigen R) or FBP1 (far-upstream-sequence-element-binding protein 1)*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 3): p. 629-39.
36. Stoecklin, G., et al., *Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4709-18.
37. Peng, S.S., et al., *RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein*. EMBO J, 1998. **17**(12): p. 3461-70.
38. Gebauer, F. and M.W. Hentze, *Molecular mechanisms of translational control*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(10): p. 827-35.
39. Shyu, A.B., M.F. Wilkinson, and A. van Hoof, *Messenger RNA regulation: to translate or to degrade*. EMBO J, 2008. **27**(3): p. 471-81.
40. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 350-5.
41. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
42. Olsen, P.H. and V. Ambros, *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation*. Dev Biol, 1999. **216**(2): p. 671-80.
43. Seggerson, K., L. Tang, and E.G. Moss, *Two genetic circuits repress the Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation*. Dev Biol, 2002. **243**(2): p. 215-25.
44. Chang, Y.F., J.S. Imam, and M.F. Wilkinson, *The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 51-74.
45. Neu-Yilik, G., et al., *Splicing and 3' end formation in the definition of nonsense-mediated decay-competent human beta-globin mRNPs*. EMBO J, 2001. **20**(3): p. 532-40.
46. Buchan, J.R., D. Muhlrads, and R. Parker, *P bodies promote stress granule assembly in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 2008. **183**(3): p. 441-55.

47. Parker, R. and U. Sheth, *P bodies and the control of mRNA translation and degradation*. Mol Cell, 2007. **25**(5): p. 635-46.
48. Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, and E. Izaurralde, *P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 9-22.
49. Keene, J.D., *RNA regulons: coordination of post-transcriptional events*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(7): p. 533-43.
50. Maffei, A., et al., *Transcriptional and post-transcriptional regulation of human MHC class II genes require the synthesis of short-lived proteins*. J Immunol, 1989. **142**(10): p. 3657-61.
51. Del Pozzo, G. and J. Guardiola, *The regulation mechanism of HLA class II gene expression at the level of mRNA stability*. Immunogenetics, 1996. **44**(6): p. 453-8.
52. Del Pozzo, G., et al., *Control of nucleo-cytoplasmic HLA-DRA mRNA partitioning by interaction of a retention signal with compartmentalized proteins*. J Mol Biol, 1994. **240**(3): p. 193-204.
53. Brady, M.S., et al., *Restoration of alloreactivity of melanoma by transduction with B7.1*. J Immunother, 2000. **23**(3): p. 353-61.
54. Pulvertaft, R.J., *Phytohaemagglutinin in Relation to Burkitt's Tumour. (African Lymphoma)*. Lancet, 1964. **2**(7359): p. 552-4.
55. Monie, T.P., et al., *Structural insights into the transcriptional and translational roles of Ebp1*. EMBO J, 2007. **26**(17): p. 3936-44.
56. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
57. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
58. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
59. Rozen, S. and H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, 2000. **132**: p. 365-86.
60. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
61. Chen, J.M., C. Ferec, and D.N. Cooper, *A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes II: the importance of mRNA secondary structure in assessing the functionality of 3' UTR variants*. Hum Genet, 2006. **120**(3): p. 301-33.
62. Chen, L., et al., *Tbx1 regulates proliferation and differentiation of multipotent heart progenitors*. Circ Res, 2009. **105**(9): p. 842-51.

63. Day, D.A. and M.F. Tuite, *Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview*. J Endocrinol, 1998. **157**(3): p. 361-71.
64. Radomski, N. and E. Jost, *Molecular cloning of a murine cDNA encoding a novel protein, p38-2G4, which varies with the cell cycle*. Exp Cell Res, 1995. **220**(2): p. 434-45.
65. Liu, Z., et al., *Ebp1 isoforms distinctively regulate cell survival and differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(29): p. 10917-22.
66. Liu, Z., et al., *Human BRE1 is an E3 ubiquitin ligase for Ebp1 tumor suppressor*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(3): p. 757-68.
67. Zhang, Y., et al., *Alterations in cell growth and signaling in ErbB3 binding protein-1 (Ebp1) deficient mice*. BMC Cell Biol, 2008. **9**: p. 69.
68. Pilipenko, E.V., et al., *A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor*. Genes Dev, 2000. **14**(16): p. 2028-45.
69. Kowalinski, E., et al., *The crystal structure of Ebp1 reveals a methionine aminopeptidase fold as binding platform for multiple interactions*. FEBS Lett, 2007. **581**(23): p. 4450-4.
70. Zhang, Y., D. Akinmade, and A.W. Hamburger, *The ErbB3 binding protein Ebp1 interacts with Sin3A to repress E2F1 and AR-mediated transcription*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(18): p. 6024-33.
71. Zhou, H., et al., *Post-transcriptional regulation of androgen receptor mRNA by an ErbB3 binding protein 1 in prostate cancer*. Nucleic Acids Res.
72. Bose, S.K., et al., *Identification of Ebp1 as a component of cytoplasmic bcl-2 mRNP (messenger ribonucleoprotein particle) complexes*. Biochem J, 2006. **396**(1): p. 99-107.
73. Squatrito, M., et al., *EBP1 is a nucleolar growth-regulating protein that is part of pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes*. Oncogene, 2004. **23**(25): p. 4454-65.
74. Squatrito, M., et al., *Ebp1 is a dsRNA-binding protein associated with ribosomes that modulates eIF2alpha phosphorylation*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **344**(3): p. 859-68.
75. Patel, R.C., et al., *DRBP76, a double-stranded RNA-binding nuclear protein, is phosphorylated by the interferon-induced protein kinase, PKR*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20432-7.
76. Barber, G.N., *The NFAR's (nuclear factors associated with dsRNA): evolutionarily conserved members of the dsRNA binding protein family*. RNA Biol, 2009. **6**(1): p. 35-9.
77. Duchange, N., et al., *Alternative splicing in the human interleukin enhancer binding factor 3 (ILF3) gene*. Gene, 2000. **261**(2): p. 345-53.
78. Saunders, L.R., et al., *Characterization of two evolutionarily conserved, alternatively spliced nuclear phosphoproteins, NFAR-1 and -2, that function in mRNA processing and interact with the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 32300-12.

79. Saunders, L.R., V. Jurecic, and G.N. Barber, *The 90- and 110-kDa human NFAR proteins are translated from two differentially spliced mRNAs encoded on chromosome 19p13*. Genomics, 2001. **71**(2): p. 256-9.
80. Xu, Y.H., T. Leonova, and G.A. Grabowski, *Cell cycle dependent intracellular distribution of two spliced isoforms of TCP/ILF3 proteins*. Mol Genet Metab, 2003. **80**(4): p. 426-36.
81. Buaas, F.W., et al., *Cloning and characterization of the mouse interleukin enhancer binding factor 3 (Ilf3) homolog in a screen for RNA binding proteins*. Mamm Genome, 1999. **10**(5): p. 451-6.
82. Shi, L., et al., *NF90 regulates inducible IL-2 gene expression in T cells*. J Exp Med, 2007. **204**(5): p. 971-7.
83. Shi, L., et al., *NF90 regulates cell cycle exit and terminal myogenic differentiation by direct binding to the 3'-untranslated region of MyoD and p21WAF1/CIP1 mRNAs*. J Biol Chem, 2005. **280**(19): p. 18981-9.
84. Shi, L., et al., *Dynamic binding of Ku80, Ku70 and NF90 to the IL-2 promoter in vivo in activated T-cells*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(7): p. 2302-10.
85. Kiesler, P., et al., *NF45 and NF90 regulate HS4-dependent interleukin-13 transcription in T cells*. J Biol Chem. **285**(11): p. 8256-67.
86. Sakamoto, S., et al., *A binding protein to the DNase I hypersensitive site II in HLA-DR alpha gene was identified as NF90*. Biochemistry, 1999. **38**(11): p. 3355-61.
87. Kuwano, Y., et al., *MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR and NF90*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(14): p. 4562-75.
88. Vumbaca, F., et al., *Double-stranded RNA-binding protein regulates vascular endothelial growth factor mRNA stability, translation, and breast cancer angiogenesis*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(2): p. 772-83.
89. Pfeifer, I., et al., *NFAR-1 and -2 modulate translation and are required for efficient host defense*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4173-8.
90. Wang, P., et al., *Nuclear factor 90 negatively regulates influenza virus replication by interacting with viral nucleoprotein*. J Virol, 2009. **83**(16): p. 7850-61.
91. Zika, E., et al., *Histone deacetylase 1/mSin3A disrupts gamma interferon-induced CIITA function and major histocompatibility complex class II enhanceosome formation*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(9): p. 3091-102.
92. Wang, A.H., et al., *Identification of the ankyrin repeat proteins ANKRA and RFXANK as novel partners of class IIa histone deacetylases*. J Biol Chem, 2005. **280**(32): p. 29117-27.
93. Xia, X., et al., *Ebp1, an ErbB-3 binding protein, interacts with Rb and affects Rb transcriptional regulation*. J Cell Physiol, 2001. **187**(2): p. 209-17.
94. Khan, A.N., W.J. Magner, and T.B. Tomasi, *An epigenetic vaccine model active in the prevention and treatment of melanoma*. J Transl Med, 2007. **5**: p. 64.

6 RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro di dottorato è stato svolto prevalentemente nel laboratorio della dott.ssa Giovanna Del Pozzo presso l'istituto IGB-CNR di Napoli, cui sono molto grata, innanzitutto, perché mi ha dato la possibilità di vivere quest'esperienza e, poi, per la disponibilità e gli insegnamenti donatimi in questi anni, che hanno contribuito ad accrescere le mie conoscenze e i miei interessi nei confronti della ricerca scientifica.

Un pensiero va anche a tutti coloro che ho avuto l'opportunità di conoscere in laboratorio che hanno contribuito alla mia formazione non solo dal punto di vista professionale ma anche umano. In particolare, vorrei ringraziare Pasquale Barba e Laura Pisapia della FACS Facility per il grande aiuto negli esperimenti di citometria a flusso.

Parte del lavoro è stato svolto nel laboratorio del prof. Paolo Abrescia, sotto la supervisione anche della dott.ssa Luisa Cigliano, presso il Dipartimento di Scienze Biologiche dell'Università di Napoli Federico II, colgo quindi l'occasione per ringraziarli per l'ospitalità e per tutti i preziosi consigli ricevuti per la realizzazione di questo lavoro.

Vorrei, inoltre, ringraziare il dott. Giuseppe Manco dell'istituto di Biochimica delle Proteine IBP-CNR di Napoli per il fondamentale contributo sperimentale dato per l'identificazione delle proteine.

Un grazie speciale va ai miei amici più cari che mi hanno sostenuto nei momenti di difficoltà rendendo questo periodo ricco di tante emozioni che porterò sempre nel mio cuore.

Vorrei ringraziare i miei genitori e la mia famiglia per avermi sostenuto in ogni momento e per aver sempre creduto in me aiutandomi a portare avanti le mie aspirazioni con serenità e grinta.

Un grazie di cuore va a Stefano che stimo profondamente, con cui mi sono confrontata spesso dal punto di vista scientifico ottenendo sempre ottimi suggerimenti. Lo ringrazio anche perché ha saputo sostenermi sempre e ha enormemente contribuito a darmi forza per proseguire e portare avanti questo progetto.